

'UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELENA AGUILAR PERES HOMEM DE MELLO DE SOUZA

**DETECÇÃO PRECOCE E MONITORAÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR
Pseudomonas aeruginosa EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA**

CURITIBA

2012

HELENA AGUILAR PERES HOMEM DE MELLO DE SOUZA

**DETECÇÃO PRECOCE E MONITORAÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR
Pseudomonas aeruginosa EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador:

Prof. Dr. Nelson A. Rosário Filho

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Libera Maria Dalla Costa

CURITIBA

2012

Souza, Helena Aguilar Peres Homem de Mello de
Detecção precoce e monitoração da colonização por *Pseudomonas aeruginosa* em crianças com fibrose cística / Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza. Curitiba, 2011.
89 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Nelson A. Rosário Filho
Co-orientadora: Libera Maria Dalla Costa

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Fibrose Cística. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Sorologia.
4. Microbiologia. 5. Anticorpos. I. Rosário Filho, Nelson A.
II. Costa, Libera Maria Dalla. III. Título.

NLM: WI 820



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos treze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e onze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: Dr. José Dirceu Ribeiro, Dr. Carlos Antonio Riedi, Dra. Sueli Massumi Nakatani, Dra. Aline Borsato Hauser e Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **HELENA AGUILAR PERES HOMEM DE MELLO DE SOUZA**, aluna concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: **“DETECÇÃO PRECOCE E MONITORAÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA”**. A Banca examinadora considerou que **HELENA AGUILAR PERES HOMEM DE MELLO DE SOUZA**, apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua aprovação, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de Doutor em Medicina Interna e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 13 de dezembro de 2011.

Dr. José Dirceu Ribeiro

Dr. Carlos Antonio Riedi

Dra. Sueli Massumi Nakatani

Dra. Aline Borsato Hauser

Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho

*Aos meus filhos,
Renata, Fernanda e André,
dedico não só este trabalho,
mas todo o meu amor e minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo seu amor e incentivo desde antes de eu me conhecer por gente.

Aos meus filhos, Renata, Fernanda e André, razão maior da minha existência, por entenderem e compartilharem as angústias dessa fase de crescimento profissional.

Aos meus amigos e familiares pelo constante apoio nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Nelson A. do Rosário e Prof.^a Dr.^a Libera Maria Dalla Costa, pelo apoio e amizade, acima de qualquer orientação acadêmica.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr.^a Cristina Rodrigues da Cruz, Dr.^a Sueli Nakatani e Prof. Dr. Renato Nishihara, pela valiosa contribuição na estrutura de apresentação deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de concretização deste desafio.

Aos colegas da Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas, pelos momentos em que estive ausente por causa da “tese”.

Aos colegas das diversas áreas do Hospital de Clínicas que torceram por mim, me incentivando e encorajando durante toda minha trajetória na instituição.

Ao Núcleo de Estudos de Bacteriologia Clínica de Curitiba, e individualmente a cada um de seus membros, pelo efetivo apoio à execução deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Antonio Riedi, por permitir o acesso aos sujeitos da pesquisa, e pelas sugestões e conhecimentos compartilhados durante o estudo.

Aos responsáveis pelos pacientes e indivíduos controles, que concordaram em participar da amostragem.

À United Medical, na pessoa do Sr. Alberto O. Lopes, pelo apoio financeiro às pesquisas em fibrose cística desenvolvidas em nosso serviço.

À Associação Brasileira de Apoio à Mucoviscidose (ABRAM), na pessoa de seu presidente, Sr. Sérgio Sampaio, pelo expressivo apoio financeiro e logístico à viabilização desta pesquisa.

À Newprov Produtos para Laboratório Ltda., pelo fornecimento de materiais emergenciais necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão de mais esta etapa da minha vida profissional.

RESUMO

A fibrose cística (FC) tem incidência de 1:9.520 nascidos vivos no Estado do Paraná. A principal causa de morbidade e mortalidade da doença é a infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* (PA), o que torna a detecção e o tratamento precoces da colonização cruciais para prevenir a instalação da bactéria. Os objetivos do presente trabalho foram documentar a evolução da colonização por PA em crianças com FC na primeira infância, e determinar o método laboratorial mais eficaz, cultura de orofaringe ou detecção de anticorpos anti-LPS de PA, na detecção precoce da presença da bactéria. Trata-se de um estudo observacional de coorte prospectivo longitudinal. Quarenta e quatro crianças diagnosticadas com FC foram acompanhadas por três anos. Foram coletados swabs de faringe posterior para cultura e amostras de sangue para quantificação de anticorpos IgG contra uma preparação padronizada de antígeno de lipopolissacáride purificado de PA, a intervalos de aproximadamente 6 meses. Foi encontrada nas culturas uma frequência total de colonização por PA em 75% dos pacientes, dos quais aproximadamente 15% eram crônicos durante todo o tempo de acompanhamento. O método laboratorial mais eficaz para o diagnóstico precoce da infecção pulmonar por PA nos pacientes estudados foi a cultura de orofaringe. A utilização do LPS purificado de PA como antígeno demonstrou soroconversão significativa anterior à cultura somente na faixa etária entre 2 e 4 anos de idade, indicando que o método sorológico utilizado não foi capaz de detectar a infecção por PA antes da cultura em todos os pacientes estudados. Entretanto, o uso concomitante de métodos tradicionais bacteriológicos (cultura) e sorológicos pode contribuir para o diagnóstico precoce da presença de PA em crianças pequenas incapazes de obter amostras respiratórias ideais para o isolamento de PA. A baixa incidência de exacerbações respiratórias, o estado nutricional adequado da maioria dos pacientes, e a baixa prevalência de colonização crônica por PA podem ser explicados, pelo menos em parte, pela eficácia do monitoramento ambulatorial oferecido aos pacientes.

Palavras-chave: Fibrose cística. *Pseudomonas aeruginosa*. Sorologia. Microbiologia. Anticorpos.

ABSTRACT

The Cystic Fibrosis incidence in the state of Paraná, Brazil, is 1 in every 9,520 newborns. Morbidity and mortality related to this disease is caused mainly by *P. aeruginosa* (PA) chronic infection, which makes detection and early colonization treatment a matter of crucial importance. This study aims to report the evolution of PA colonization and to determine the most effective laboratory method between oropharynx culture and anti-PA antibodies detection for early pulmonary infection diagnosis in CF children. It is an observational longitudinal cohort study. Forty-four CF children diagnosed by neonatal screening were followed for 3 years. The regular CF protocol management at UFPR Hospital de Clínicas includes posterior pharyngeal swabs collection for microbiological culture. In addition, blood samples collected approximately every 6 months were submitted to IgG antibodies quantification through ELISA using a PA purified lipopolysaccharide. Seventy five percent of the patients had PA colonization by culture, and 15% of them were chronic throughout the follow-up. Colonization incidence increased directly with age. The most effective laboratory method for early diagnosis of pulmonary infection by PA was the oropharyngeal culture. The use of purified LPS as an PA antigen demonstrated significant seroconversion before culture only in the 2-4 years old group, indicating that the serological method used was not able to detect the infection by PA before the culture in all patients. However, the concomitant use of bacteriological and serological methods can contribute to the early diagnosis of the PA presence in small children unable to obtain optimal respiratory samples for PA isolation. The low incidence of respiratory exacerbations, the nutritional status of most patients, and the low prevalence of chronic colonization by PA can be explained, at least in part, by the effectiveness of ambulatory monitoring offered to patients.

Key-words: Cystic fibrosis. *Pseudomonas aeruginosa*. Serology. Microbiology. Antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS RESPIRATÓRIOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS - 2008.....	20
FIGURA 2 - MODIFICAÇÕES DO LPS DE PA DURANTE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS NA FC	29
FIGURA 3 - PROPORÇÃO DE PACIENTES COM CULTURAS POSITIVAS PARA AS BACTÉRIAS MAIS FREQUENTES NAS 6 AMOSTRAS.....	46
FIGURA 4 - FREQUÊNCIA DE CULTURAS POSITIVAS PARA PA DE ACORDO COM A IDADE NAS 6 AMOSTRAS.....	47
FIGURA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE A MÉDIA DAS IDADES DOS PACIENTES E A CAPACIDADE DO TESTE SOROLÓGICO PARA DETECTAR COLONIZAÇÃO POR PA ANTES DA CULTURA EM CADA VISITA	50
FIGURA 6 - EXEMPLO DE CURVA ROC PARA IDENTIFICAÇÃO DO PONTO DE CORTE DA SOROLOGIA CONSIDERANDO-SE A CULTURA COMO PADRÃO OURO.....	52
FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DA DETECÇÃO DE PA POR CULTURA OU SOROLOGIA RELACIONADA À IDADE DOS PACIENTES.....	54
FIGURA 8 - CURVAS ROC PARA DEFINIÇÃO DOS PONTOS DE CORTE PARA A SOROLOGIA EM TRÊS GRUPOS ETÁRIOS DIFERENTES, CONSIDERANDO A CULTURA COMO PADRÃO-OURO.....	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO-FERMENTADORES DE DIFÍCIL IDENTIFICAÇÃO ISOLADOS DE PACIENTES COM FC	26
QUADRO 2 - CRITÉRIOS PARA DEFINIÇÃO DO <i>STATUS</i> DA COLONIZAÇÃO POR PA EM PACIENTES COM FC	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MICRO-ORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS ISOLADOS DO TRATO RESPIRATÓRIO DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.....	19
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM FC AVALIADOS POR 3 ANOS	43
TABELA 3 - FREQUÊNCIA POR PACIENTE DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS NAS CULTURAS DAS AMOSTRAS DE OROFARINGE	45
TABELA 4 - ASSOCIAÇÃO DO STATUS (COLONIZADO OU NÃO) E IMC (NORMAL OU BAIXO) NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE	47
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE.....	48
TABELA 6 - ASSOCIAÇÃO DE HISTÓRICO DE EXACERBAÇÃO PULMONAR E IMC (NORMAL OU BAIXO) NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE	49
TABELA 7 - TESTES ESTATÍSTICOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IDADE SOBRE A ESPECIFICIDADE E A SENSIBILIDADE DA SOROLOGIA	51
TABELA 8 - QUALIDADE DO AJUSTE DAS CURVAS ROC PARA DETERMINAR OS PONTOS DE CORTE PARA CADA VISITA.....	52
TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IGG ANTI-PA X PRESENÇA DE PA NAS CULTURAS X HISTÓRIA DE EXACERBAÇÃO NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE	53
TABELA10 - VALORES INFERIDOS DAS CURVAS ROC POR FAIXA ETÁRIA.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACHB	- Ágar chocolate com bacitracina
BCSA	- Ágar seletivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
BSA	- Soroalbumina bovina
CBC	- complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CEP-HC	- Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CFF	- <i>Cystic Fibrosis Foundation</i> (EUA)
CFT	- <i>Cystic Fibrosis Trust</i> (Reino Unido)
CFTR	- Proteína reguladora de condutância transmembrânica
CIE	- Contraímunoeletroforese
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
CV	- Coeficiente de variação
DO	- Densidade ótica
DP	- Desvio padrão
E	- Especificidade
ELISA	- Enzimaimunoensaio
FC	- Fibrose cística
HI	- <i>Haemophilus influenzae</i>
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IMC	- Índice de massa corporal
LPS	- Lipopolissacarídeo
MC	- Ágar MacConkey
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSA	- Ágar manitol salgado
PA	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAm	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> fenótipo mucoide
PBS	- Tampão salina fosfatada
PCD	- Discinesia ciliar primária
PCR	- Reação em cadeia da polimerase

PFGE	- Eletroforese em campo pulsado
ROC	- Curva de Características de Operação do Receptor
S	- Sensibilidade
SA	- <i>Staphylococcus aureus</i>
SD	- Desvio padrão
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio
SSH	- Solução salina hipertônica
SSTT	- Sistema de secreção tipo III
STD	- Padrão
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
UA	- Unidades Arbitrárias
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VPN	- Valor preditivo negativo
VPP	- Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 PATOFISIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA	16
2.1.1 Infecção e inflamação pulmonar	16
2.1.2 Insuficiência pancreática e diabetes	17
2.1.3 Alterações biliares	18
2.1.4 Alterações do trato reprodutivo	18
2.2 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA	18
2.2.1 <i>Pseudomonas</i>	20
2.2.2 Diagnóstico microbiológico da infecção pulmonar	22
2.2.2.1 Coleta de amostras respiratórias	22
2.2.2.2 Transporte e processamento das amostras	25
2.2.2.3 Identificação microbiana	26
2.2.3 Diagnóstico sorológico da infecção	26
2.2.3.1 LPS como antígeno	28
2.2.4 Diagnóstico molecular da infecção	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	34
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	34
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1 CASUÍSTICA	35
4.2 MÉTODOS:	37
4.2.1 Obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	37
4.2.2 Coleta e transporte das amostras	38
4.2.3 Processamento dos materiais biológicos para estudo microbiológico	38
4.2.4 Identificação bacteriana fenotípica	39
4.2.5 Processamento dos materiais biológicos para determinação de anticorpos Anti-PA	40
4.2.6 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	43

6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE 1 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE TESE PELO COMITÊ DE	
	ÉTICA	79
	APÊNDICE 2 - APROVAÇÃO DOS TERMOS DE CONSENTIMENTO	
	PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	81
	ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO DOS CONTROLES	
	NEGATIVOS	84
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO DOS CONTROLES	
	POSITIVOS.....	86
	ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO DOS SUJEITOS DA	
	PESQUISA.....	88

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC), ou mucoviscidose, é uma doença genética grave, monogênica recessiva, encontrada predominantemente em populações caucasianas de ascendência europeia (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002), com incidência de cerca de um em cada 2.500 nascidos vivos, e frequência de portador do defeito genético de aproximadamente 1 em 25 (RASKIN *et al.*, 2008). Afeta aproximadamente 30.000 indivíduos nos Estados Unidos e 60.000 indivíduos em todo o mundo, com incidência na população branca daquele país variando de 1:1.900 a 1:3.700 (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

Pesquisa realizada em cinco estados brasileiros estimou a incidência da FC em descendentes de europeus no Brasil em 1:7.576, e a frequência de portadores em 2,3% (RASKIN *et al.*, 2008). O Programa Nacional para Triagem Neonatal da Fibrose Cística no Estado do Paraná, após 30 meses de implantação, examinou 98% de todos os neonatos no período. A incidência da FC no Estado do Paraná foi calculada em 1:9520 (SANTOS *et al.*, 2005), e este valor mais baixo pode ser explicado pela frequente miscigenação de etnias, apesar da alta incidência de descendentes de europeus na população.

A incidência crescente de casos da doença diagnosticados pela triagem neonatal levou à criação de um ambulatório especial para o acompanhamento e orientação terapêutica desses pacientes no Hospital de Clínicas da UFPR. Como parte do monitoramento foram desenvolvidas técnicas especiais para o isolamento de micro-organismos relevantes para esta população, com a coleta de amostras respiratórias em todas as visitas ambulatoriais. A dificuldade de obtenção de amostras adequadas nas crianças pequenas não-expectorantes levou à procura de técnicas alternativas para a detecção precoce da colonização microbiana, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (PA), reconhecidamente o agente etiológico mais importante para o prognóstico da doença.

A pesquisa de anticorpos anti-PA no soro dos pacientes foi demonstrada por alguns autores como eficaz na detecção precoce da colonização pela bactéria; sendo assim, decidiu-se testar um método sorológico em comparação ao método tradicional de cultivo de amostras respiratórias, especificamente de material de orofaringe, com

a intenção de detectar o mais precocemente possível a colonização por PA. Sendo assim, foi desenvolvida *in house* uma técnica de enzimaímunoensaio utilizando como antígeno o lipopolissacáride extraído de PA, segundo orientação do Dr. Tyrone Pitt, do Laboratório Central de Saúde Pública, Londres, Reino Unido.

O objetivo principal do presente trabalho foi documentar a evolução precoce da colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* em crianças na primeira infância, antes do aparecimento de sintomas de comprometimento respiratório característico da doença. Culturas seriadas de material de orofaringe foram realizadas durante um ano de acompanhamento dos pacientes diagnosticados pela triagem neonatal e geraram uma primeira publicação (SOUZA *et al.*, 2006). Na sequência, decidiu-se aprimorar as técnicas microbiológicas e testar uma técnica sorológica como coadjuvante no diagnóstico da colonização por PA. Os resultados dos exames microbiológicos e sorológicos foram compilados prospectivamente por três anos, e analisados no presente trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PATOFISIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

A fibrose cística é um distúrbio autossômico recessivo causado por mutações em um único gene de 230 kb no braço longo do cromossomo 7, que codifica um polipeptídeo de 1480 aminoácidos denominado “proteína reguladora da condutância transmembrânica” (*transmembrane conductance regulator protein* – CFTR). Esta proteína funciona como canal de cloreto nas membranas epiteliais, e, em condições normais, regula o fluxo iônico transepitelial para manter adequados a composição iônica e o volume do fluido aéreo de superfície (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003; RATJEN; DORING, 2003).

Apesar dos avanços no entendimento da base molecular e da patofisiologia da doença, continua sendo a doença genética grave mais comum na população branca, com sobrevida média estimada em aproximadamente 37 anos nos Estados Unidos em 2008 (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2008).

A natureza genética da FC leva a alterações patológicas nos órgãos que expressam a CFTR, como as células secretoras, seios paranasais, pulmões, pâncreas, fígado e trato reprodutor. As manifestações mais evidentes são observadas nas vias aéreas, onde o defeito genético básico causa infecções pulmonares crônicas (RATJEN; DORING, 2003).

2.1.1 Infecção e inflamação pulmonar

Por razões ainda não completamente entendidas, as alterações do fluido aéreo resultantes do CFTR deficiente ou disfuncional tornam os pacientes com FC suscetíveis a infecções endobrônquicas crônicas. A resposta inflamatória neutrofílica associada leva a doença pulmonar progressiva e, ao final, insuficiência pulmonar, a causa primária de óbito em FC (LIPUMA, 2010). A infecção pulmonar crônica por *P.*

aeruginosa permite que o processo patológico básico da FC seja considerado uma doença infecciosa, e, ao final, 80 a 95% dos pacientes com FC sucumbem à insuficiência respiratória decorrente da infecção bacteriana crônica e concomitante inflamação da via aérea (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002).

Diversas hipóteses tentam correlacionar mutações na CFTR com o desenvolvimento da infecção, e apesar de questionáveis, uma resposta inflamatória neutrofílica extensa, exacerbada e persistente a patógenos bacterianos e virais é uma característica da doença pulmonar na FC. A inflamação está presente mesmo em pacientes clinicamente estáveis com alguma doença pulmonar e em crianças pequenas diagnosticadas pela triagem neonatal, e esta inflamação endobrônquica persistente é considerada determinante para o desenvolvimento da doença pulmonar (RATJEN; DORING, 2003).

2.1.2 Insuficiência pancreática e diabetes

A insuficiência exócrina pancreática está presente em aproximadamente 90% dos pacientes com FC. A doença pancreática é atribuída ao volume reduzido de secreção pancreática com baixas concentrações de bicarbonato. Sem secreção e bicarbonato suficientes, as proenzimas digestivas são retidas nos ductos pancreáticos e ativadas precocemente, levando à destruição tecidual e fibrose. A síndrome de má absorção resultante contribui para a falha em suprir as demandas energéticas aumentadas pelo estado hipermetabólico associado à infecção endobrônquica. Há correlação inversa entre a demanda de energia e a função pulmonar. As infecções pulmonares podem levar a redução do apetite e vômitos, aumentando posteriormente a desnutrição. Estes fatores podem exacerbar a infecção pulmonar, levando a um ciclo vicioso de desnutrição e infecção (RATJEN; DORING, 2003).

As ilhotas de Langerhans são inicialmente poupadas pela fibrose pancreática, e o *diabetes mellitus* é raro na primeira década de vida; a prevalência da doença aumenta com a idade. O diabetes em pacientes com FC apresenta características da doença do tipo 1 e 2, e uma combinação de secreção reduzida e lenta de insulina

com resistência à insulina está presente na maioria dos pacientes (RATJEN; DORING, 2003).

2.1.3 Alterações biliares

A CFTR é expressa nas células do trato biliar, e pelo menos um terço dos pacientes apresenta resultados anormais dos testes de função hepática. Infiltração gordurosa é relatada em até 70% dos pacientes; em menos de 10% deles a infiltração progride para cirrose biliar. A vesícula biliar é pequena e disfuncional em até 30% dos pacientes com FC, e cálculos podem se desenvolver em até 10%. Crianças pequenas podem apresentar colestase devido à bile com concentrações anormais dos constituintes e espessada (RATJEN; DORING, 2003).

2.1.4 Alterações do trato reprodutivo

Azoospermia secundária à ausência ou atresia dos vasos deferentes e vesícula seminal dilatada ou ausente levam à infertilidade 98% dos homens com FC; a potência sexual e a espermatogênese são normais. A função reprodutora feminina é normal, apesar da possível desidratação do muco cervical, que pode afetar a fertilidade (RATJEN; DORING, 2003).

2.2 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

As espécies bacterianas mais comumente associadas com infecção do trato respiratório na FC incluem patógenos humanos clássicos como *S. aureus* e *H. influenzae* bem como diversos patógenos oportunistas, sendo o mais importante *P. aeruginosa*. Outros oportunistas incluem patógenos nosocomiais tais como *Stenotrophomonas*

maltophilia e *Achromobacter xylosoxidans* e espécies que são apenas ocasionalmente associadas a infecções humanas com exceção da FC, como o complexo *B. cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp. e *Pandoraea* spp. (Tabela 1). Apesar de algumas espécies estarem associadas com mal prognóstico na FC, o papel de outras espécies na progressão da doença permanece duvidoso (LIPUMA, 2010).

Uma variedade de leveduras e fungos filamentosos tem sido isolada de culturas de amostras respiratórias de pacientes com FC; dentre eles *Aspergillus fumigatus* tem recebido maior atenção por ser a espécie de fungo filamentoso mais comumente isolada e por ser capaz de desencadear resposta inflamatória alérgica crônica ou infecção invasiva após transplante de pulmão. Outras espécies de fungos como *Exophiala dermatitidis* e *Scedosporium* spp. estão sendo cada vez mais reconhecidas como capazes de causar infecção ou colonização crônica das vias respiratórias de pacientes com FC (LIPUMA, 2010).

TABELA 1 - MICRO-ORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGENICOS ISOLADOS DO TRATO RESPIRATÓRIO DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

MICRO-ORGANISMO	FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO (%) ⁽¹⁾	PACIENTES COM FC	PAPEL NA DOENÇA PULMONAR DA FC
<i>P. aeruginosa</i>	51,7	Todos	Comprovado
<i>S. aureus</i>	65,8	Crianças e adolescentes	Comprovado
complexo <i>B. cepacia</i>	2,7	Crianças e adolescentes	Comprovado
<i>S. maltophilia</i>	12,7	Crianças e adolescentes	Desconhecido
<i>A. xylosoxidans</i>	NR ⁽²⁾	Crianças e adolescentes	Desconhecido
<i>B. gladioli</i>	NR	Crianças e adolescentes	Improvável
<i>Ralstonia</i> spp.	NR	Crianças e adolescentes	Improvável
<i>Pandoraea</i> spp.	NR	Crianças e adolescentes	Improvável
<i>Mycobacterium</i> spp. não <i>M. tuberculosis</i>	NR	Crianças e adolescentes	Comprovado
<i>H. influenzae</i>	16	Crianças	Provável
<i>A. fumigatus</i>	14 ⁽³⁾	Todos	Comprovado
Vírus sincicial respiratório	NR	Crianças	Comprovado
Vírus influenza	NR	Todos	Comprovado

FONTE: Adaptado de Miller e Gilligan (2003)

(1) Dados do Cystic Fibrosis Patient Registry Report 2009 (CFF, 2009).

(2) NR = não relatado.

(3) Dados do Cystic Fibrosis Patient Registry Report 2008 (CFF, 2008).

P. aeruginosa é a espécie bacteriana mais comumente envolvida em infecção do trato respiratório em pacientes com FC. A prevalência da infecção varia significativamente com a idade, de aproximadamente 25% em crianças com 5 anos ou menos, até 80% dos adultos entre 25 e 34 anos nos EUA. O complexo *B. cepacia* também apresenta prevalência variável conforme a idade, com taxas de até 8% em adultos. *S. aureus* é frequentemente o primeiro patógeno bacteriano encontrado no trato respiratório de pacientes com FC, tendo sido isolado de mais de 60% das crianças

com 6 a 10 anos de idade e adolescentes entre 11 e 17 anos. *H. influenzae* foi isolado de aproximadamente 20% das crianças com FC abaixo de 1 ano de idade; a maior prevalência foi de 32% para crianças entre 2 e 5 anos, diminuindo para menos de 10% entre adultos com FC (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2008) (Figura 1).

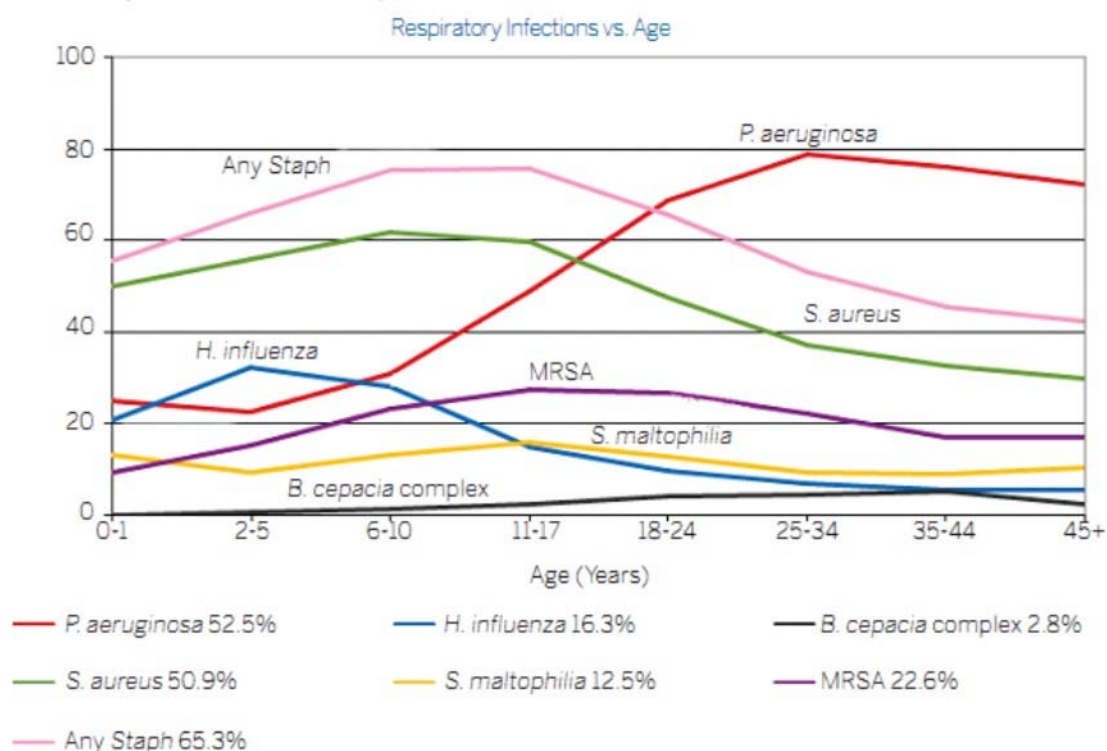


FIGURA 1 - PREVALÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS RESPIRATÓRIOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS - 2008
FONTE: CFF (2008)

2.2.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas é um gênero extenso e complexo de bactérias gram-negativas importantes, contendo espécies significativas dos pontos de vista clínico e ambiental (HENRY; SPEERT, 2011). As espécies do gênero são ubíquas com predileção por ambientes úmidos, sendo encontradas na água, no solo e em vegetais, incluindo frutas. *P. aeruginosa* não é encontrada com frequência na microbiota de indivíduos saudáveis (HOLT *et al.*, 1994); infecções endógenas ocorrem somente em indivíduos com desequilíbrio da resistência natural oferecida pela microbiota normal, como por exemplo na bacteriemia secundária à colonização do trato gastrointestinal em pacientes

neutropênicos e pneumonia associada a ventilação mecânica (TANCREDE; ANDREMONT, 1985; MOREHEAD; PINTO, 2000). As infecções por *P. aeruginosa* que ocorrem em pacientes com FC são provavelmente exógenas, uma vez que os isolados iniciais geralmente se assemelham a morfotipos ambientais (OGLE *et al.*, 1987), apesar de ter sido demonstrada transmissão pessoa-a-pessoa ocasionalmente.

P. aeruginosa é a espécie bacteriana mais comumente envolvida na infecção do trato respiratório da FC (LIPUMA, 2010). A prevalência da infecção varia significativamente com a idade, de aproximadamente 25% para crianças com menos de 5 anos, até 80% em adultos de 25 a 34 anos de idade (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2008). A maneira como os pacientes adquirem a bactéria, entretanto, é pouco entendida. Diversos estudos têm demonstrado um único clone em grupos particulares de pacientes que são atendidos no mesmo centro de saúde, e a explicação mais plausível seria a transmissão paciente-paciente (ARMSTRONG *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2002). A maioria dos pacientes alberga uma única cepa durante a infecção e poder-se-ia, então, concluir que a bactéria teria sido adquirida de uma fonte ambiental. Entretanto, um estudo envolvendo grande número de pacientes acompanhados por mais de 20 anos no Canadá não conseguiu demonstrar transmissão paciente-a-paciente de *P. aeruginosa*, exceto entre gêmeos que adquiriram a bactéria de uma fonte ambiental comum (SPEERT *et al.*, 2002).

A espécie *P. aeruginosa* parece ter um tropismo particular pelas células do epitélio respiratório de pacientes com FC, conseguindo resistir aos mecanismos normais de defesa do trato respiratório do hospedeiro. Uma vez estabelecida, a infecção geralmente persiste e a bactéria sofre transição para o chamado “fenótipo FC”, que consiste nas seguintes características:

- 1.^a) um lipopolissacáride (LPS) em que o polissacarídeo O não é completamente expresso, tornando a bactéria suscetível ao efeito bactericida do soro humano (HANCOCK *et al.*, 1983);
- 2.^a) morfologia colonial mucoide resultante da produção exacerbada de um exopolissacarídeo mucoide (alginato) (LINKER; JONES, 1966);
- 3.^a) perda da motilidade devido a perda da função flagelar (MAHENTHIRALINGAM; CAMPBELL; SPEERT, 1994);
- 4.^a) hipoeexpressão de várias exotoxinas e outros produtos extracelulares (BURKE *et al.*, 1991; WOODS *et al.*, 1986).

A transição do fenótipo não-mucoide para o mucoide no pulmão de pacientes com FC está geralmente associada a um declínio acelerado da função pulmonar e a um prognóstico ruim, talvez devido à capacidade do exopolissacarídeo mucoide de interferir nas defesas fagocitárias normais do hospedeiro e de facilitar a formação de biofilmes (GOVAN; DERETIC, 1996). Além disso, os pacientes recebem ciclos frequentes de terapia antimicrobiana, tornando a bactéria da infecção crônica resistente a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos (HANCOCK; SPEERT, 2000).

2.2.2 Diagnóstico microbiológico da infecção pulmonar

A qualidade dos cuidados clínicos oferecidos a pacientes com FC por um centro especializado depende de um bom suporte microbiológico. Os micro-organismos que infectam o paciente determinarão o tratamento, a qualidade de vida, a indicação para transplante pulmonar e a sobrevida. A identificação precisa e imediata de patógenos respiratórios é essencial para assegurar um pronto início do tratamento erradicatório da infecção precoce com patógenos bacterianos, o uso prolongado de antibióticos adequados para os pacientes com infecção crônica e a aplicação de medidas de controle de infecção apropriadas (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010, p.10).

2.2.2.1 Coleta de amostras respiratórias

A detecção de bactérias no trato respiratório inferior é feita pela cultura de escarro expectorado. Em crianças, bem como em outros indivíduos incapazes de expectorar, a secreção da orofaringe é cultivada, apesar da acurácia diagnóstica do procedimento não fornecer resultados confiáveis. Ramsey *et al.* (1991), estudando 43 pacientes com idades variando de 4 meses a 25 anos, expectorantes e não-expectorantes, compararam os resultados das culturas de orofaringe com as culturas de secreções brônquicas obtidas simultaneamente, sendo estas consideradas padrão-ouro. De modo geral, as culturas de orofaringe apresentaram alta especificidade, com alto valor preditivo positivo para PA (83%) ou *S. aureus* (91%). Os resultados sugeriram que uma criança com FC com *P. aeruginosa* ou *S. aureus* isolados em

cultura de orofaringe deveria ter o patógeno no trato respiratório inferior, enquanto uma cultura negativa não excluía sua presença.

Armstrong *et al.* (1996) selecionaram 75 crianças com FC diagnosticada pela triagem neonatal com média de idade de 17 meses, e calcularam os valores preditivos de culturas de orofaringe em relação a culturas de lavado broncoalveolar para *S. aureus*, *H. influenzae* e *P. aeruginosa*. Apesar da sensibilidade das culturas de orofaringe para detectar infecções do trato respiratório inferior ter sido baixa (71%), uma cultura negativa indicou 97% de chance de ausência de infecção.

Rosenfeld *et al.* (1999) obtiveram resultados semelhantes aos dois estudos citados quanto à sensibilidade e especificidade, em três protocolos com coletas simultâneas de orofaringe e lavado broncoalveolar de crianças incapazes de expectorar. Nos pacientes até 18 meses de idade, encontraram baixa sensibilidade para PA (44%), enquanto a especificidade foi alta (95%), e valores preditivos positivo e negativo similares (44 e 95%, respectivamente). Os autores ponderaram, entretanto, que a utilidade clínica de culturas de orofaringe está relacionada ao seu valor preditivo ao invés da sua sensibilidade e especificidade. Portanto, cultura de orofaringe negativa foi útil para excluir a presença da bactéria no trato respiratório inferior, enquanto cultura positiva não previa confiavelmente sua presença, com resultados similares para *S. aureus* e *H. influenzae*.

Embora seja considerada padrão-ouro para a detecção de PA no trato respiratório inferior, até mesmo a cultura de lavado broncoalveolar pode não refletir o que está acontecendo no pulmão, conforme lembrado por Burns *et al.* (2001). A amostragem regional do pulmão pode não prever acuradamente os micro-organismos presentes em outras áreas. Além disso, bactérias aderentes às rolhas de muco podem não ser amostradas pelo lavado broncoalveolar.

Em amostras de orofaringe, escarro e lavado bronco-alveolar de 38 pacientes com FC cultivadas para isolamento de PA, os isolados da bactéria foram tipados por eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) (JUNG, 2002). Os valores preditivos positivo e negativo para detecção de PA foram de 83,3% e 73,5% para culturas de orofaringe de pacientes não-expectorantes, e 100% e 94,1% para culturas de escarro de pacientes expectorantes, respectivamente. A tipagem molecular demonstrou que os genótipos dos isolados de PA obtidos de amostras de orofaringe e de escarro eram diferentes dos obtidos por broncoscopia

em 55% e 40%, respectivamente. Os autores concluíram que o escarro teve igual valor ao lavado broncoalveolar para a detecção de PA, mas que as culturas de orofaringe não eram adequadas a esta finalidade.

Equi *et al.* (2001) analisaram prospectivamente “swabs de tosse” obtidos de crianças com FC e compararam com amostras concomitantes de escarro de 30 pacientes expectorantes. Este tipo de amostra é obtido colocando o swab na garganta do paciente, sem tocar a faringe posterior, e pedindo ao paciente que tussa, de maneira que a secreção expectorada possa ser recolhida com o swab. Um “swab de tosse” positivo para os patógenos PA, PA mucoide (PAm), *S. aureus* (SA), *S. maltophilia* e complexo *B. cepacia* teve estreita correlação com a cultura de escarro, entretanto, um “swab de tosse” negativo não excluía infecção por estas bactérias. Este tipo de amostra mostrou especificidade de 100% e sensibilidade de 34% em relação à amostra de escarro. O valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 21%.

Kabra *et al.* (2004) compararam swabs de garganta obtidos antes e após fisioterapia com amostras de escarro de 48 pacientes com FC. A sensibilidade para isolamento de PA das amostras de garganta obtidas antes e após fisioterapia foi de 42% e 82%, respectivamente, e de 50% e 100% para SA. A especificidade foi alta (99-100%) em ambos os métodos para PA e SA.

Em estudo envolvendo 43 crianças com FC, amostras de escarro ou “swabs de tosse” foram comparados com amostras induzidas, obtidas após nebulização com solução salina hipertônica a 6% (SSH). Dezenove pacientes conseguiram expectorar após a indução com SSH, 4 amostras pré-SSH foram positivas quando negativas pós-SSH, e 13 amostras pós-SSH foram positivas com as amostras correspondentes pré-SSH negativas. Os resultados alteraram positivamente a conduta clínica em 30% dos pacientes, com base nos resultados de culturas que detectaram patógenos somente nas amostras coletadas pós-nebulização com SSH. A prática foi bem tolerada por 41 dos 43 pacientes avaliados (HO *et al.*, 2004). Outros estudos recentes comprovaram a segurança e tolerabilidade da SSH a 3 e 7% em crianças pequenas com FC (SUBBARAO *et al.*, 2007; DELLON *et al.*, 2008).

De acordo com o recente consenso publicado pelo grupo de trabalho em Microbiologia Clínica do *Cystic Fibrosis Trust*, órgão do Reino Unido de apoio e pesquisa em FC (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010), deverão ser coletadas amostras

respiratórias em cada consulta hospitalar e quando ocorrer exacerbação respiratória. Escarro é a amostra recomendada para coleta de rotina, e “swab de tosse” deve ser utilizado somente quando não for possível obter uma amostra expectorada.

2.2.2.2 Transporte e processamento das amostras

As amostras processadas imediatamente após a coleta propiciarão os melhores resultados, uma vez que tanto o armazenamento à temperatura ambiente como sob refrigeração podem interferir no crescimento de alguns patógenos (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010). A Sociedade Americana de Microbiologia, entretanto, recomenda, quando necessário transportar amostras a longas distâncias, fazê-lo à temperatura de 4°C, uma vez que PA sobrevive por 24 horas sob esta condição (GILLIGAN, 2010).

Os meios recomendados pela Sociedade Americana de Microbiologia para cultivo de amostras respiratórias de pacientes com FC são os seguintes: ágar MacConkey (MC) ou ágar eosina-azul de metileno para isolamento de PA e outros bacilos gram-negativos, em especial não-fermentadores de glicose; ágar seletivo para isolamento de bactérias do complexo *B. cepacia* (BCSA); ágar manitol salgado (MSA) ou ágar cromogênico para isolamento de *S. aureus*; ágar sangue de cavalo ou ágar chocolate suplementado com bacitracina (ACHB) para isolamento de *H. influenzae* e ágar Sabouraud dextrose para isolamento de fungos (GILLIGAN; KISKA; APPLEMAN, 2006). As placas dos meios seletivos para isolamento de bacilos gram-negativos e estafilococos devem ser incubadas a 35-37°C, em ar ambiente, por pelo menos 48 horas; as placas de meio seletivo para hemófilos devem ser incubadas a 35-37°C em 5% de CO₂ por pelo menos 48 horas; as placas de meios seletivos para o complexo *B. cepacia* devem ser incubadas a 35-37°C em ar ambiente por 5 dias e examinadas diariamente. Os tubos ou placas do meio para isolamento de fungos devem ser incubados a 35-37°C em ar ambiente por até 7 dias. Como o isolamento de *H. influenzae* pode representar contaminação do trato respiratório superior, é recomendado relatar a quantidade aproximada de colônias presentes (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010).

2.2.2.3 Identificação microbiana

A correta identificação das espécies bacterianas mais comumente isoladas de pacientes com FC é fundamental para o tratamento adequado e o mais precoce possível da colonização, uma vez que, apesar dos grandes avanços no cuidado destes pacientes, a infecção do trato respiratório permanece como a causa principal de morbidade e mortalidade (LIPUMA, 2010). O já citado consenso do *Cystic Fibrosis Trust* recomenda que, além dos patógenos reconhecidamente envolvidos na infecção respiratória de pacientes com FC, todos os bacilos gram-negativos não-fermentadores isolados destes pacientes sejam corretamente identificados, o que pode apresentar alguma dificuldade para os laboratórios de Microbiologia Clínica não acostumados com o processamento de amostras respiratórias de pacientes com FC (Quadro 1). A identificação fenotípica equivocada de PA e do complexo *B. cepacia* pode ter consequências clínicas importantes, como antibioticoterapia desnecessária ou inadequada ou segregação desnecessária dos pacientes, portanto, métodos moleculares devem ser utilizados sempre que necessário (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010).

<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Pandoraea sputorum</i>
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Cupriavidus respiraculi</i>	<i>Ralstonia insidiosa</i>
<i>Inquilinus limosus</i>	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>
<i>Pandoraea apista</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
<i>Pandoraea phoenicis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

QUADRO 1 - BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO-FERMENTADORES DE DIFÍCIL IDENTIFICAÇÃO ISOLADOS DE PACIENTES COM FC
FONTE: CFT (2010)

2.2.3 Diagnóstico sorológico da infecção

A infecção por PA pode também ser demonstrada pela detecção da resposta imunológica ao micro-organismo. Anticorpos anti-PA podem surgir meses antes das culturas tornarem-se positivas, e constituem uma ferramenta útil para monitorar a infecção em pacientes colonizados (TRAMPER-STRANDERS; van der ENT; WOLFS, 2005).

Um dos primeiros trabalhos publicados sobre a pesquisa de anticorpos anti-PA em pacientes com FC utilizou como método a contraímunoeletroforese de “precipitinas” específicas. Os autores verificaram, num período de acompanhamento de 5 anos, que o número de precipitinas aumentou em média 5 unidades por ano em pacientes crônicos, e que o aumento rápido estava associado a um mal prognóstico (HOIBY, 1977). Doring e Hoiby (1983) estudaram durante 10 anos 10 pacientes com FC utilizando três antígenos diferentes: protease alcalina, elastase e “antígeno padrão de PA”, por radioimunoensaio e contraímunoeletroforese. A resposta imunológica aumentou em nove pacientes após o estabelecimento da infecção crônica por PA ao longo dos anos. Os autores concluíram que os anticorpos pesquisados estavam sendo francamente produzidos durante a infecção, enquanto o estado clínico piorava. A resposta imunológica detectada em menor tempo durante o estudo foi contra os antígenos hidrossolúveis (antígeno padrão), após seis meses em média, e dentre eles a exotoxina A poderia ser considerada uma potencial candidata para funcionar como antígeno específico em estudos futuros (DORING; HOIBY, 1983).

Klinger *et al.* (1978) pesquisaram a presença de anticorpos no soro de pacientes fibrocísticos e de indivíduos normais contra substâncias tóxicas isoladas e purificadas de PA capazes de provocar efeitos deletérios no pulmão de modelos *in vitro* e *in vivo* (exotoxina A e enzimas proteolíticas). Foi demonstrada correlação significativa entre o score clínico e os níveis de anticorpos.

No início dos anos 80 já se conhecia o efeito inibidor do soro de pacientes FC cronicamente colonizados com PA sobre a fagocitose da bactéria por macrófagos alveolares (THOMASSEN *et al.*, 1980). Shryock *et al.* (1986) evidenciaram que os pacientes FC produziam subclasses de IgG não-opsonizantes dirigidas ao lipopolissacáride (LPS) de PA em resposta à colonização crônica, concomitantemente ao desenvolvimento de atividade inibidora da fagocitose.

Poucos anos mais tarde foram introduzidos testes mais sensíveis e específicos utilizando enzimaímunoensaio (ELISA) para a detecção dos anticorpos anti-PA. Brett, Ghoneim e Littlewood (1986) prepararam antígenos de superfície de células totais de PA, incluindo os sorotipos mais isolados em sua instituição, e pesquisaram anticorpos IgG específicos no soro dos pacientes. Os indivíduos não colonizados com PA apresentaram títulos baixos, enquanto os colonizados continuamente e com doença pulmonar tinham os títulos mais altos. Os pacientes com PA intermitente

apresentaram valores mais baixos que os crônicos. Os autores concluíram que o teste de ELISA poderia ser adequado para diferenciar entre colonização e infecção por PA na FC.

Em seguida antígenos diferentes começaram a ser analisados comparativamente na mesma população, com resultados que variavam conforme o antígeno (fosfolipase C, protease alcalina, exotoxina A ou elastase) (JAGGER *et al.*, 1982; HOLLSING *et al.*, 1987). Um dos estudos, por exemplo, concluiu que a resposta à fosfolipase C poderia ser utilizada para detectar colonização crônica quando não fosse possível coletar amostras de escarro para cultura, e que títulos crescentes para exotoxina A e elastase poderiam ser sinais precoces de infecção ativa (GRANSTROM *et al.*, 1984).

Desde então, diferentes antígenos têm sido utilizados com a mesma finalidade: detectar o quanto antes a presença de PA no pulmão fibrocístico. Fosfolipase C, protease alcalina, exotoxina A, elastase, suspensão de células totais, lisado celular foram os antígenos mais estudados (HOLLSING *et al.*, 1987; BRETT; GHONEIM; LITTLEWOOD, 1988; BURNS *et al.*, 2001; WEST *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2005). Em 2001, Moss *et al.* relataram o uso de proteínas do “sistema de secreção tipo III” (SSTT) de PA, responsável pela citotoxicidade observada em infecções pela bactéria. As citotoxinas ExoS, ExoT, ExoU e ExoY, além das proteínas transportadoras PopB e PopD, fatores de virulência de PA, eram expressos em infecções crônicas de pacientes adultos com FC e contribuíam para a patogenicidade da bactéria em infecções agudas.

2.2.3.1 LPS como antígeno

LPS são moléculas da superfície celular comuns a todas as bactérias gram-negativas. Consistem de uma porção carboidrato-lipídica, o “lipídio A”, que prende a molécula do LPS à membrana externa da bactéria, e uma porção carboidrato, composta de um oligossacarídeo curto, o “core”, e uma cadeia lateral polissacarídica de alto peso molecular (Figura 2). Dentro de uma mesma espécie existe pouca variação nas estruturas do core e do lipídio A, mas a cadeia lateral polissacarídica é altamente variável. Tais estruturas variáveis são frequentemente denominadas “antígenos O”, e

sua variabilidade é utilizada em esquemas de tipagem imunológica para distinguir sorotipos dentro de uma espécie em particular (ARSENAULT *et al.*, 1991).

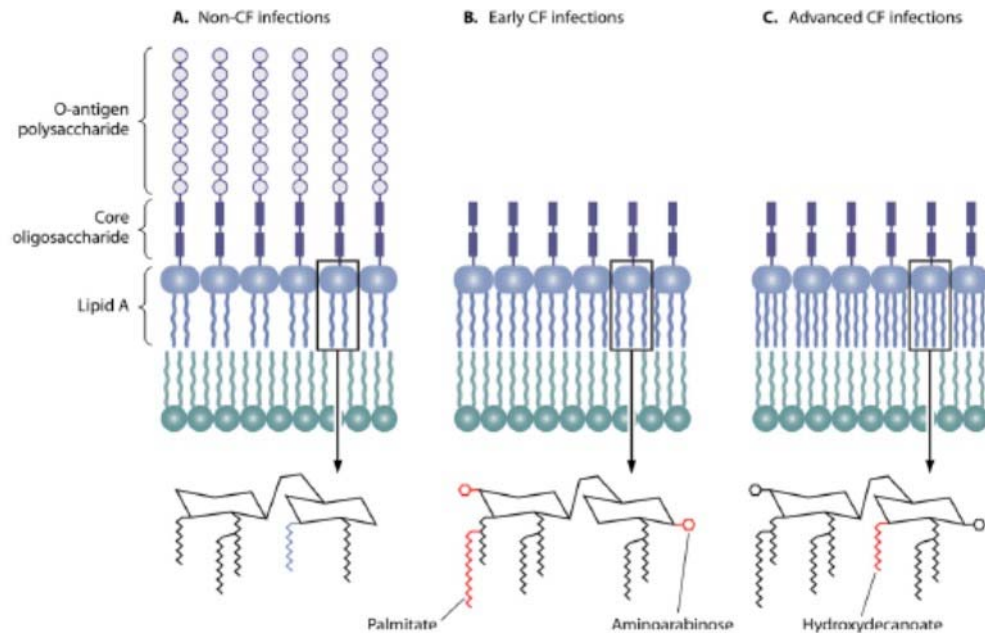


FIGURA 2 - MODIFICAÇÕES DO LPS DE PA DURANTE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS NA FC

FONTE: Adaptado de Hauser *et al.* (2011)

NOTA: A) Estruturas de LPS de cepas isoladas do ambiente, infecções agudas ou bronquiectasias; na parte de baixo da figura está mais detalhada a estrutura do lipídio A. Os polígonos grandes representam o esqueleto de bifosfato de glicosamina do lipídio A, e as linhas serrilhadas representam os grupos acil; B) Durante o início da infecção por PA em pacientes com FC o antígeno O polissacarídico é perdido, e o palmitato (linhas serrilhadas vermelhas) e a aminoarabinose (círculos vermelhos) são adicionados ao lipídio A; C) Em pacientes com FC avançada uma cadeia hidroxidecanoato (linha serrilhada vermelha) é retida.

Uma vez estabelecidas no pulmão fibrocístico, as colônias de PA tornam-se não-tipáveis (não-aglutináveis ou poliaglutináveis), implicando que os antígenos O não estão mais presentes (HANCOCK *et al.*, 1983). Lam *et al.* (1989), entretanto, demonstraram pelo uso de anticorpos monoclonais, que a expressão do LPS banda A é conservada em uma alta porcentagem de isolados clínicos de pacientes com FC. Hauser *et al.* (2011) relataram que a própria porção A do LPS de PA pode estar alterada na FC, implicando em consequências biológicas importantes, como aumento da resistência a peptídios antimicrobianos e diminuição da visibilidade da bactéria pelo sistema imune do hospedeiro (Figura 2).

Fomsgaard *et al.* (1988) demonstraram que o LPS é fortemente imunogênico e pode ser utilizado como um único e bem definido antígeno em métodos sensíveis como ELISA e *immunoblotting* para diagnosticar e acompanhar a evolução da infecção pulmonar crônica por PA em pacientes com FC. Em 1990, um estudo realizado na

Universidade de Berna, Suíça, pesquisou anticorpos IgG contra o LPS de 9 sorotipos de PA no soro de 78 pacientes com FC por ELISA. Em 10 pacientes sem colonização com PA não foram encontrados níveis detectáveis de anticorpos. Nos pacientes com infecção crônica (46/78) os títulos de anticorpos foram significativamente maiores que nos pacientes com infecção intermitente (22/78). Os valores médios de anticorpos correlacionaram-se com a duração da colonização e com a gravidade da doença. Os autores concluíram que os anticorpos anti-LPS de PA poderiam ser medida sensível da gravidade e do prognóstico da FC (SCHAAD *et al.*, 1990).

Brauner *et al.* (1993) analisaram na Suécia anticorpos IgG contra o LPS de 9 cepas de PA e contra exotoxina A no soro de 51 pacientes com FC. Trinta e cinco pacientes cronicamente colonizados com PA possuíam níveis significativamente mais altos de anticorpos contra todos os antígenos testados em comparação a 16 pacientes com colonização intermitente ou não-colonizados. A resposta pronunciada a antígenos LPS heterólogos levou os autores a sugerirem que havia expressão de um determinante antigênico comum.

Fomsgaard *et al.* (1993), na Dinamarca, estudaram a reatividade do LPS extraído de 20 cepas diferentes de PA contra o soro de pacientes FC cronicamente infectados. Observaram uma resposta imunológica inesperada a todos os LPS, enquanto somente poucos sorotipos de PA foram isolados dos pacientes. Experimentos de absorção utilizando LPS purificado e quimicamente definido, extraído tanto de cepas não-mucoides como mucoides, sugeriram que a resposta imunológica seria devida a anticorpos contra o “core/lipídio A” bem como aos polissacarídeos O de menor peso molecular ou “bandas A”.

Um estudo realizado em 1988 comparou imunoquimicamente os LPS de cepas tipáveis e poliaglutináveis de PA isoladas de pacientes FC. A cepa poliaglutinável continha um LPS deficiente de polissacarídeos O, e a reação cruzada observada poderia ser explicada por anticorpos contra determinantes antigênicos comuns ligados à porção core/lipídio A do LPS (FOMSGAARD *et al.*, 1988).

Rivera e McGroarty (1989) demonstraram que LPS isolados de diversas cepas de PA eram heterogêneos por filtração em gel e SDS-PAGE. As análises revelaram que os LPS isolados de cepas PAO1 continham duas bandas distintas, sugerindo que tais cepas eram capazes de sintetizar mais de um tipo de molécula química e antigenicamente diferentes. A banda menor (“banda A”) não reagia com anticorpos

monoclonais contra o antígeno O, e a cadeia lateral polissacarídica era menor que a do antígeno O. A “banda B” correspondia à descrição clássica do LPS. Posteriormente foi postulado que a banda A estava presente concomitantemente à banda B nos cultivos, mas que a expressão da banda B era cessada sob certas condições, como antibioticoterapia prolongada, deixando o LPS banda A como principal antígeno de superfície.

Weisner *et al.* (2007) investigaram a presença do LPS banda A em 49 isolados de PA provenientes de diferentes pacientes com FC de várias clínicas especializadas, e em 20 cepas dos sorotipos O1-O6, O9-O11, O-13 e O16-O20. Dos isolados clínicos, 45 das 49 cepas expressaram LPS banda A, bem como 15 das 20 cepas sorotipadas. Os resultados confirmaram, portanto, que a maioria dos isolados clínicos de PA produzem LPS banda A.

A cepa de PA AK1401 é uma mutante rugosa da cepa PAO1 que, apesar de ser deficiente na síntese de antígenos O, produz LPS de alto peso molecular que reage com anticorpos monoclonais específicos para a banda A (LAM *et al.*, 1989). Desta forma, a cepa AK1401 pode ser usada como fonte de LPS banda A livre de antígenos O contaminantes, e também para a triagem de amostras de soro para presença de anticorpos anti-LPS banda A.

Anticorpos IgG e IgM contra antígenos LPS de diversos sorotipos O de PA foram detectados no soro de doadores de sangue sadios por ELISA (GRZYBOWSKI *et al.*, 1989), mas os níveis na população geral, especificamente contra a banda A do LPS, ainda são desconhecidos. Devido à ubiquidade da bactéria, é possível que indivíduos sadios sejam expostos a cepas ambientais e produzam anticorpos (WEISNER *et al.*, 2007), gerando, assim, “memória imunológica”. Em fluidos orais de 17 pacientes FC adultos com cultura de escarro positiva para PA, 11 pacientes com discinesia ciliar primária (PCD) e 37 voluntários sadios foram detectados anticorpos fortemente reativos contra a banda A do LPS em todos os pacientes com FC por *immunoblotting*, mas 10 amostras de voluntários sadios provocaram reações fracas. Seis dos pacientes com PCD tiveram reação fraca com anticorpos banda A e somente um demonstrou anticorpos contra o *core* do LPS. Por método de ELISA quantitativo, os fluidos orais de 15 dos 17 pacientes FC mostraram conter anticorpos antibanda A do LPS, contra nenhum dos voluntários sadios. Todas as amostras de soro obtidas dos pacientes FC foram positivas por ambos os métodos. Apesar da

presença de anticorpos não ser necessariamente indicativa de infecção atual, a detecção de respostas iniciais e subseqüentes aumentos nos títulos são de potencial valor clínico (WEISNER *et al.*, 2007).

2.2.4 Diagnóstico molecular da infecção

A detecção precoce de PA pelo método convencional de cultura em crianças com FC incapazes de expectorar é dificultada pela baixa densidade da bactéria em amostras de orofaringe. A obtenção de amostras por lavado bronco-alveolar, por sua vez, não é uma prática facilmente realizada de maneira regular. O método alternativo de detecção de anticorpos anti-PA está disponível sob a forma de *kits* comerciais somente em alguns países. A partir deste cenário diversos métodos moleculares foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a detecção de PA em amostras respiratórias. Xu *et al.* (2004) demonstraram que uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, baseada na amplificação dos genes *oprL* (lipoproteína de membrana externa) e *exoA* (exotoxina A) diretamente em amostras de escarro de pacientes com FC permitia a detecção de novas colonizações. No entanto, a sensibilidade não foi adequada e 8,8% dos pacientes foram positivos para PA pela cultura e negativos por PCR para ambos os genes-alvo. O PCR quantitativo é um método mais confiável e sensível e pode ser uma ferramenta útil associada à cultura para o diagnóstico da colonização precoce por PA e para a verificação da erradicação da bactéria após terapia antimicrobiana em crianças com FC (BILLARD-POMARES *et al.*, 2011).

McCulloch *et al.* (2011) analisaram 500 *swabs* de tosse e 42 amostras de escarro de pacientes pediátricos por um método quantitativo de PCR em tempo real e por cultura convencional. Os autores demonstraram que a detecção de PA poderia ser incrementada pelo método de PCR em tempo real em 100% nas amostras coletadas com *swab* e 45% nas amostras de escarro. A sensibilidade geral foi de 100% e a especificidade de 58% quando o método molecular foi comparado com a cultura como padrão-ouro. Entretanto os próprios autores recomendaram cuidado na consideração destes resultados, do ponto de vista do tratamento e do controle de

infecção, pois o significado da detecção de concentrações muito baixas de PA não está ainda definido.

Um estudo anterior que utilizou um método de PCR “multiplex” em amostras respiratórias mostrou que PA foi isolado por cultura em 56% das amostras enquanto o PCR foi positivo em 78,7%, com sensibilidade e especificidade do PCR para detecção bacteriana, comparado a cultura, de 97,2% e 45%, respectivamente (DA SILVA FILHO *et al.*, 2004). Outro estudo realizado posteriormente no mesmo centro, utilizando uma combinação de PCR, sorologia e cultura demonstrou que foi possível isolar PA por cultura nas amostras de escarro e orofaringe de 42 pacientes (48,2%), enquanto o PCR foi positivo em 53 (60,9%) e a sorologia em 38 pacientes (43,6%) (DA SILVA FILHO *et al.*, 2007). O método molecular identificou um número maior de pacientes com PA do que a sorologia e a cultura convencional, mas a diferença não atingiu significância estatística. Qualquer combinação de métodos que incluía PCR resultou em diferenças estatisticamente significativas em relação aos métodos microbiológico e sorológico isoladamente. O método molecular sozinho, entretanto, não se mostrou suficientemente eficaz, sugerindo que o PCR pode ser um método adicional para a detecção de PA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Documentar a evolução precoce da colonização por *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus* e bactérias do complexo *B. cepacia* em crianças na primeira infância, antes do aparecimento de sintomas de comprometimento respiratório característico da doença.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a associação entre a idade dos pacientes e a prevalência de colonização por PA;
- Avaliar a associação entre o estado nutricional e a colonização por *P. aeruginosa* nos pacientes incluídos no estudo;
- Avaliar a associação entre o estado nutricional e a frequência de exacerbações pulmonares nos pacientes incluídos no estudo;
- Verificar a utilidade das culturas de orofaringe no diagnóstico da colonização por *P. aeruginosa* em crianças pequenas com FC;
- Validar um teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-LPS de *P. aeruginosa* no soro de pacientes com FC;
- Avaliar a correlação entre a idade dos pacientes e a capacidade do teste sorológico para detectar colonização por *P. aeruginosa* antes da cultura;
- Construir curvas de características de operação do receptor (curvas ROC) para determinar os melhores valores de ponto de corte para os resultados da sorologia, para cada momento de tomada das amostras;
- Verificar a relação entre exacerbações da infecção pulmonar e a presença de anticorpos circulantes anti-PA nos pacientes incluídos no estudo;
- Determinar o método laboratorial mais eficaz, cultura de orofaringe ou detecção de anticorpos anti-LPS de *P. aeruginosa*, no diagnóstico precoce da infecção pulmonar por PA nos pacientes incluídos no estudo.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP-HC), em reunião realizada em 30 de agosto de 2005 (Apêndice 1).

Trata-se de um estudo observacional de coorte prospectivo longitudinal. Foram selecionadas para o estudo crianças com FC, suspeitas de portarem a doença pela triagem neonatal (pesquisa de tripsina imunorreativa), e confirmadas através da determinação da condutividade e dosagem de sódio ou cloretos no suor. Foram incluídos no estudo pacientes atendidos regularmente no Ambulatório de Fibrose Cística de Recém-Natos do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), situado em Curitiba, Paraná, Brasil, cujos pais ou responsáveis autorizaram sua participação, pelo período de três anos, com início em 13 de fevereiro de 2006 e término em 16 de fevereiro de 2009, totalizando 44 pacientes. Foram excluídos do estudo os pacientes selecionados que não compareceram regularmente ao ambulatório ou cujos pais ou responsáveis não autorizaram sua participação.

O acompanhamento microbiológico dos pacientes contou com a técnica tradicional de cultura de amostras de orofaringe e a pesquisa de anticorpos anti-PA no soro, além do monitoramento de sinais e sintomas de exacerbação pulmonar, durante todo o período do estudo.

Como rotina do atendimento ambulatorial, foi feita anamnese geral e investigados sintomas respiratórios, gastrointestinais e hábitos alimentares. Ao exame físico geral foram verificados dados vitais, peso, estatura e IMC para a idade de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Foi considerada exacerbação de sintomas respiratórios quando pelo menos dois dos seguintes sinais estavam presentes: piora da tosse, alteração do aspecto do escarro, febre, perda de peso e uso de antibióticos.

A conduta geral foi a seguinte: pacientes com colonização crônica foram atendidos separadamente dos pacientes não colonizados; as exacerbações respiratórias

foram tratadas com antibióticos de acordo com o resultado das culturas (pacientes com colonização intermitente receberam um ciclo de ciprofloxacino e colimicina inalatória duas vezes ao dia por 3 meses, e neste período foram realizadas culturas de escarro ou *swab* de orofaringe mensais). Pacientes com colonização crônica por *Pseudomonas* receberam antibiótico inalatório (colimicina ou tobramicina) de forma contínua. Aqueles com sinais e sintomas de insuficiência pancreática receberam enzimas pancreáticas. Todos passaram por avaliação nutricional e os casos com dificuldade de ganho de peso foram orientados pelo Serviço de Nutrição.

Todos receberam suplementação de vitaminas lipossolúveis e vacinação básica, além de vacina antipneumocócica conjugada; foi também recomendada vacinação para influenza.

Foram coletados *swabs* de faringe posterior durante o período do estudo como parte do protocolo de atendimento rotineiro. A periodicidade das coletas obedeceu os intervalos de consultas estabelecidos por aquele ambulatório, de acordo com a evolução clínica de cada paciente.

Foram constituídos três grupos, de acordo com os resultados das culturas de orofaringe durante o período do estudo e no ano anterior, segundo critérios propostos por Lee *et al.* (2003) e adaptados como demonstrado no Quadro 2. O isolamento de PA em pelo menos três culturas com no mínimo um mês de intervalo entre elas, durante o período mínimo de 6 meses, caracterizou o grupo de pacientes com “colonização crônica”. O grupo com “colonização intermitente” compreendeu os pacientes com isolamento de PA em culturas não consecutivas, com menos de 3 culturas positivas em 6 meses. Os pacientes considerados “livres de PA” não apresentaram isolamento da bactéria durante o período do estudo e no ano anterior. Foram coletadas amostras de sangue de todos os pacientes incluídos no estudo para execução de exames de rotina (hemograma, dosagem de albumina e ureia), com intervalos aproximados de seis meses. Uma alíquota do soro foi separada e armazenada a -80°C para posterior detecção de anticorpos anti-PA em até seis amostras por paciente (total de amostras: 251).

STATUS	CRITÉRIOS DE LEE	ADAPTAÇÃO HC-UFPR
Infecção crônica	Mais de 50% das culturas são positivas para PA	Isolamento de PA em pelo menos três culturas com no mínimo um mês de intervalo entre elas, durante o período mínimo de 6 meses
Infecção intermitente	50% ou menos das culturas são positivas para PA	Isolamento de PA em culturas não consecutivas, com menos de 3 culturas positivas em 6 meses.
Livre de infecção	Ausência de crescimento de PA no ano anterior, tendo sido isolado previamente a este período	Ausência de PA durante o período do estudo e no ano anterior
Infecção ausente	Nunca foi isolado PA nas culturas de escarro ou OP	

QUADRO 2 - CRITÉRIOS PARA DEFINIÇÃO DO STATUS DA COLONIZAÇÃO POR PA EM PACIENTES COM FC
 FONTE: Lee *et al.* (2003)

Foram obtidas 40 amostras de sangue de voluntários sadios após consentimento (Anexo 2), com idades variando de 24 a 156 meses (média: 74,9 meses; mediana: 69,5 meses), recrutados em escolas e creches da rede pública, sem evidências de doença pulmonar ou infecção por PA. Foram também coletadas amostras de sangue de nove voluntários com FC e infecção crônica por PA, com idades variando de 10 a 23 anos, recrutados nos ambulatórios de FC do Hospital de Clínicas da UFPR, após consentimento (Anexo 3). Estas amostras foram utilizadas para validação da técnica de dosagem de anticorpos.

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 Obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Os responsáveis pelos pacientes foram devidamente esclarecidos quanto à natureza do estudo e os possíveis benefícios advindos da pesquisa. Foi detalhado o procedimento de coleta dos materiais biológicos e assegurada a ausência de riscos ao sujeito. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido referentes ao projeto foram analisados e aprovados pelo CEP-HC (Apêndice 2) e assinados pelos responsáveis legais do paciente, no momento da coleta da primeira amostra dos materiais biológicos (Anexo 1) (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

4.2.2 Coleta e transporte das amostras

Amostras para cultura foram coletadas com *swab* estéril de pilares tonsilares e faringe posterior, após nebulização por 10 minutos com solução salina hipertônica (1,5ml de solução de cloreto de sódio a 20% diluído em 3ml de solução fisiológica; concentração final aproximada de 7%) (HO *et al.*, 2004). O material biológico de orofaringe (*swab*) foi transportado em tubos com 1ml de tampão salina fostatado (PBS) contendo 0,1% de gelatina bacteriológica, em caixa isotérmica (RAMSEY *et al.*, 1991).

Amostras de sangue foram coletadas com sistema a vácuo utilizado rotineiramente pela Unidade de Apoio Diagnóstico do HC-UFPR, e transportadas nos tubos primários de coleta na mesma caixa.

4.2.3 Processamento dos materiais biológicos para estudo microbiológico

- Homogeneização de cada *swab* de orofaringe em agitador elétrico tipo vórtex por 30 segundos.
- Inoculação da suspensão homogeneizada da amostra de orofaringe com alça calibrada de 10 microlitros (0,01ml) em placas com diferentes meios de cultura, a saber: ágar chocolate suplementado com 20.000 unidades/litro de bacitracina (ACHB), ágar MacConkey (MC), ágar manitol salgado (MSA) e ágar seletivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA), de maneira a propiciar avaliação semiquantitativa do crescimento bacteriano (GILLIGAN, 2010).
- Incubação das placas de MC e MSA a 35-36°C por 48 horas e das placas de BCSA por até 72 horas em atmosfera normal, e das placas de ACHB por 48 horas em jarra sob tensão a 5-10% de CO₂.

4.2.4 Identificação bacteriana fenotípica

As colônias suspeitas de pertencerem às espécies classicamente isoladas nesta população de pacientes, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, complexo *Burkholderia cepacia*, outros bacilos gram-negativos não-fermentadores de glicose e *Aspergillus fumigatus* foram identificadas pelos métodos de rotina das Seções de Bacteriologia e Micologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR, seguindo literatura atualizada (GILLIGAN, 2010; HENRY; SPEERT, 2011).

Para a identificação de *S. aureus*, as colônias suspeitas nas placas de ágar MSA (médias, amarelas, lisas, com bordos inteiros e levemente elevados) foram submetidas à prova da coagulase ligada (em tubo).

A identificação presuntiva de *P. aeruginosa* pela prova da oxidase procedeu-se nas colônias lactose-negativas, rugosas ou mucoides e com odor característico na placa de ágar MC. Em caso positivo, a espécie foi confirmada por provas de utilização da glicose em meio de Rugai e crescimento em ágar cetrimide a 35 e 42°C.

Para a identificação de *H. influenzae*, as colônias suspeitas e com odor característico na placa de ágar ACHB (médias a grandes, acinzentadas, semiopacas, lisas, ligeiramente chatas e convexas) foram submetidas às provas do satelitismo, à pesquisa de beta-lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica e identificação automatizada utilizando painéis NIH do equipamento VITEK-2 (BioMérieux™).

Para a identificação do complexo *B. cepacia* as colônias suspeitas desenvolvidas no ágar BCSA foram submetidas às provas iniciais de identificação de bacilos gram-negativos não-fermentadores, como: oxidase, fermentação da glicose, motilidade e suscetibilidade a polimixina. Para caracterização da espécie utilizou-se provas complementares de acordo com Lipuma *et al.* (2011).

Para a identificação de outros bacilos gram-negativos não-fermentadores, as colônias suspeitas no ágar MC foram submetidas a provas tais como oxidase, fermentação da glicose, motilidade, hemólise em ágar-sangue de carneiro, suscetibilidade à polimixina e crescimento a 44°C. Quando necessário, provas complementares foram realizadas (LIPUMA *et al.*, 2011).

As colônias de fungos filamentosos desenvolvidas em ágar Sabouraud-dextrose foram examinadas microscopicamente e classificadas como compatíveis com o gênero *Aspergillus* de acordo com as características conidiogênicas. As colônias de leveduras foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* conforme as características morfológicas coloniais e celulares (PINHEIRO; MURO; FERNANDES, 2011).

4.2.5 Processamento dos materiais biológicos para determinação de anticorpos Anti-PA

Para a detecção e quantificação de anticorpos anti-PA foi realizada técnica de ELISA de acordo com Weisner *et al.* (2007). O ensaio foi realizado manualmente utilizando microplacas de fundo chato (Maxisorb, NUNC, Dinamarca).

O antígeno utilizado no teste foi o LPS da cepa de *P. aeruginosa* AK1401, gentilmente cedido pelo Dr. Tyrone Pitt (Laboratório Central de Saúde Pública, Londres, Reino Unido). A adsorção prévia do antígeno nas placas foi realizada com 100 microlitros do LPS diluído a 1µg/ml em tampão carbonato (Na_2CO_3 15Mm, NaHCO_2 34,5 Mm, Ph 9.6), aplicados a cada poço e incubados *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados três vezes em Tween 20 a 0.05% (v/v) em PBS para remoção do material não ligado e 200µL de solução bloqueadora (soroalbumina bovina, BSA, a 1% p/v em tampão salina fosfatada, PBS) foram adicionados para bloquear a ligação, e incubados por 30 minutos a 37°C. Para remover todo o material em excesso os poços foram lavados três vezes com Tween 20 a 0.05% (v/v) em PBS.

As amostras de soro dos pacientes e os controles positivo (STD) e negativo (N) (igualmente cedidos pelo Dr. T. Pitt) foram diluídos a 1/200 em BSA a 1% (p/v) em PBS e mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos. Cem microlitros dos soros testes diluídos 1/200 foram adicionados em duplicata para detecção de anticorpos de classe IgG, além de um “blank” de BSA em PBS a 1% (p/v). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C e lavadas com Tween 20 a 0,05% (v/v) em PBS para remoção dos anticorpos não ligados.

Foram adicionados 100µL de anticorpo “secundário” anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina em coelho (Dako Cytomation), diluído a 1/1000 em BSA a 1%

(p/v) em PBS. As placas foram então incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas três vezes com Tween 20 a 0,05% (v/v) em PBS, para remoção dos anticorpos secundários que não se ligaram aos primários.

Para desenvolver o ELISA, foi adicionado o cromógeno *p*-nitrofenol fosfato (200µL a 1mg/ml em tampão substrato - dietanolamina 0.9 M, MgCl₂ 2 Mm, pH 9.6, à temperatura ambiente), que atuou como substrato da fosfatase alcalina, e as placas mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A absorbância foi quantificada em densidade ótica (DO) a 405 nm com filtro de 620nm quando a amostra STD atingiu 2.5 A₄₀₅ +/- 10 %. Para facilitar a interpretação dos resultados os valores de DO foram convertidos em unidades arbitrárias (UA), sendo que a absorbância igual a 1,0 equivaleu a 100UA/ml. Os resultados foram aceitos se o valor para a amostra N era inferior a 50UA/ml +/- 10%. A média, o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (CV) foram calculados para as amostras duplicadas. O CV máximo obtido foi de 11,7%, embora a técnica previsse que um CV menor que 20 % permitiria que o valor médio dos resultados fosse aceito para a amostra. O valor máximo obtido para o “*blank*” foi de 21,7UA/ml. O ponto de corte (ou *cut off*) utilizado para o teste (117,0UA/ml) foi estabelecido a partir da média dos valores de IgG obtidos para os voluntários sadios, somada a duas vezes o desvio padrão.

4.2.6 Análise estatística

Os dados clínicos, microbiológicos e sorológicos obtidos foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis qualitativas). Para a comparação entre dois grupos em relação a variáveis clínicas quantitativas foi considerado o teste t de Student para amostras independentes. Para três grupos esta comparação foi feita usando-se um modelo de análise univariada. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Para avaliação da associação entre variáveis qualitativas microbiológicas e clínicas dicotômicas foi considerado o teste exato de Fisher.

A avaliação da associação entre variáveis sorológicas quantitativas foi efetuada considerando-se o coeficiente de correlação de Spearman. Para a comparação dos três grupos definidos de acordo com o status de colonização em relação ao resultado da sorologia para PA foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste foi escolhido devido a um dos grupos apresentar número de indivíduos muito pequeno, indicando a aplicação de um teste não-paramétrico. Para avaliar a associação do aumento dos títulos de IgG com a mudança de negativo para positivo em relação à cultura para PA, foi considerado o teste exato de Fisher. Curvas ROC foram ajustadas para determinar os pontos de corte para os valores de IgG para três grupos etários (menor que 2 anos, de 2 a 4 anos, e maior que 4 anos de idade). Para determinação dos índices de qualidade da sorologia os resultados de cultura foram considerados como padrão ouro, estimando-se os resultados de sensibilidade e especificidade com seus respectivos intervalos de 95% de confiança. Foram estimados os valores preditivos positivo e negativo para diferentes prevalências de PA na população estudada.

Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

5 RESULTADOS

No período entre 13 de fevereiro de 2006 e 16 de fevereiro de 2009 quarenta e quatro pacientes diagnosticados com FC pela triagem neonatal foram selecionados para o estudo, após o consentimento de seus pais ou responsáveis. As características demográficas e clínicas dos pacientes analisados estão demonstradas na Tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM FC AVALIADOS POR 3 ANOS

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA (%)
Gênero	
Feminino	17 (38,6)
Masculino	27 (61,4)
Idade ao diagnóstico (meses), Mediana (min-max)	1,5 (0,6-8,2)
Idade durante o estudo (meses), Mediana (min-max)	38 (2-90)
Colonização com PA	
Intermitente	28 (63,6)
Crônica	5 (11,3)
Ausente (livre)	11 (25,0)
Intervalo entre as coletas de orofaringe (dias), Mediana (min-max)	62,5 (7-235)
Intervalo entre as coletas de soro (meses)	6 (aproximadamente)
Total de culturas (média por paciente)	712 (15)
Total de sorologias (média por paciente)	251 (5,7)

A idade das crianças recrutadas variou de 2 a 90 meses, com média de 38,9 meses e mediana de 38 meses; 61,4% eram do gênero masculino e 38,6% do gênero feminino.

O material biológico da orofaringe foi coletado em todas as consultas de acompanhamento rotineiro, totalizando 712 amostras, com média de 15 amostras por paciente (5 amostras por ano). O intervalo entre as coletas variou de 7 a 235 dias, com mediana de 62,5 dias. Os pacientes foram divididos em três grupos, de acordo com os resultados das culturas de orofaringe durante o período do estudo e no ano anterior, segundo critérios adaptados a partir dos propostos por Lee *et al.* (2003) – Quadro 2. Vinte e oito pacientes foram classificados como intermitentes, 11 pacientes como livres de PA, e cinco pacientes como colonizados crônicos.

Foram coletadas amostras de sangue com intervalos aproximados de seis meses, e uma alíquota do soro foi separada para detecção de anticorpos anti-PA em até seis amostras por paciente (total de amostras: 251).

A Tabela 3 sumariza os resultados das culturas de orofaringe nas 6 amostras coletadas simultaneamente às tomadas de amostras de sangue para a pesquisa de anticorpos anti-PA. Os micro-organismos prevalentes foram *Staphylococcus aureus* (SA) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA). SA apresentou-se com frequência de 23,6%, incluindo cepas oxacilina-sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA); PA foi isolado, incluindo cepas mucoides e não-mucoides, em 10,6% dos pacientes, em média. As bactérias do complexo *B. cepacia* (CBC) foram isoladas em 2,8% dos pacientes, e *Haemophilus influenzae* em 2,6%. Foram observadas em diversas culturas associações destes micro-organismos, sendo que SA foi o micro-organismo mais frequente nas associações, estando presente juntamente com outros micro-organismos em 7,8% dos pacientes. PA foi isolado associado a outros micro-organismos em 6% dos pacientes. As associações contendo CBC e HI foram encontradas em 2,6% e 2,3% dos pacientes, em média. Leveduras foram isoladas em 12,6% dos pacientes, porém este achado não foi considerado significativo, mas constituinte da microbiota normal da orofaringe. Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* foram encontrados em apenas uma amostra de dois pacientes, e também não foram considerados significativos. A grande maioria das culturas revelou presença de um ou mais micro-organismos de interesse para a doença FC, com apenas 13,8% dos pacientes apresentando culturas negativas.

TABELA 3 - FREQUÊNCIA POR PACIENTE DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS NAS CULTURAS DAS AMOSTRAS DE OROFARINGE

	FREQUÊNCIA												
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Amostra 6		Média
	n	Freq (%)	n	Freq (%)	n	Freq (%)	n	Freq (%)	n	Freq (%)	n	Freq (%)	Freq (%)
PA ou PAm	43	10 (23,2)	44	7 (15,9)	44	11 (25)	44	11 (25)	44	13 (29,5)	44	12 (27,3)	24,3
SA ou MRSA	43	22 (51,2)	44	26 (59,1)	44	27 (61,4)	44	23 (52,3)	44	23 (52,3)	44	21 (47,7)	54,0
CBC	43	4 (9,3)	44	2 (4,5)	44	0 (0,0)	44	4 (9,1)	44	2 (4,5)	44	5 (11,4)	6,5
HI	43	5 (11,6)	44	4 (9,1)	44	2 (4,5)	44	8 (18,2)	44	4 (9,1)	44	5 (11,4)	10,6
PA ou PAm associado	43	6 (14,0)	44	5 (11,4)	44	6 (13,6)	44	6 (13,6)	44	7 (15,9)	44	6 (13,6)	13,7
SA ou MRSA associado	43	9 (20,9)	44	7 (15,9)	44	6 (13,6)	44	9 (20,5)	44	7 (15,9)	44	9 (20,5)	17,9
CBC associado	43	4 (9,3)	44	2 (4,5)	44	0 (0,0)	44	4 (9,1)	44	1 (2,3)	44	5 (11,4)	6,1
HI associado	43	3 (7,0)	44	3 (6,8)	44	0 (0,0)	44	3 (6,8)	44	2 (4,5)	44	3 (6,8)	5,3
Leveduras	38	8 (21,1)	43	12 (27,9)	43	13 (30,2)	44	19 (43,2)	44	12 (27,3)	42	12 (28,6)	29,7
<i>Aspergillus</i> sp.	38	0 (0,0)	43	0 (0,0)	43	2 (4,7)	44	0 (0,0)	44	0 (0,0)	42	0 (0,0)	0,3
Nenhum (cultura negativa)	43	14 (32,6)	44	18 (40,9)	44	18 (40,9)	44	9 (20,5)	44	11 (25,0)	44	13 (29,5)	31,6

NOTA: PA = *P. aeruginosa*; PAm = PA mucoide; AS = *S. aureus*; MRSA = SA resistente a metilicina; CBC = complexo *B. cepacia*; HI = *H. influenzae*; associado = concomitantemente a outros micro-organismos.

A Figura 3 ilustra a proporção de culturas positivas para as bactérias mais frequentes, considerando o número de pacientes que apresentaram estes micro-organismos nas 6 amostras analisadas.

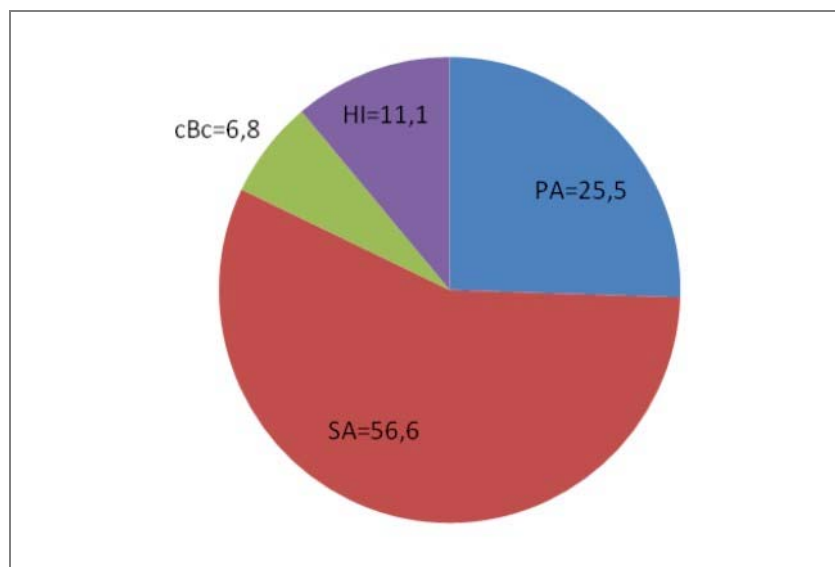


FIGURA 3 - PROPORÇÃO DE PACIENTES COM CULTURAS POSITIVAS PARA AS BACTÉRIAS MAIS FREQUENTES NAS 6 AMOSTRAS

FONTE: A autora

NOTA: SA= *S. aureus*; PA = *P. aeruginosa*; HI = *H. influenzae*; cBc = complexo *B. cepacia*.

Na Figura 4, as idades médias dos pacientes nas 6 ocasiões em que amostras microbiológicas e sorológicas foram obtidas foram correlacionadas com a frequência de culturas positivas para PA. A incidência de colonização por PA detectada pela cultura de amostras de orofaringe aumentou diretamente com a idade. Para avaliação da associação entre idade e prevalência de *P. aeruginosa*, testou-se a hipótese nula de correlação entre estas variáveis igual a zero (inexistência de associação), *versus* a hipótese alternativa de correlação diferente de zero (existência de associação). O coeficiente de correlação de Spearman estimado foi igual a 0,87 e o valor de p igual a 0,024. Desta forma, rejeita-se a hipótese nula, considerando-se assim um indicativo de existência de associação positiva entre idade e prevalência de PA.

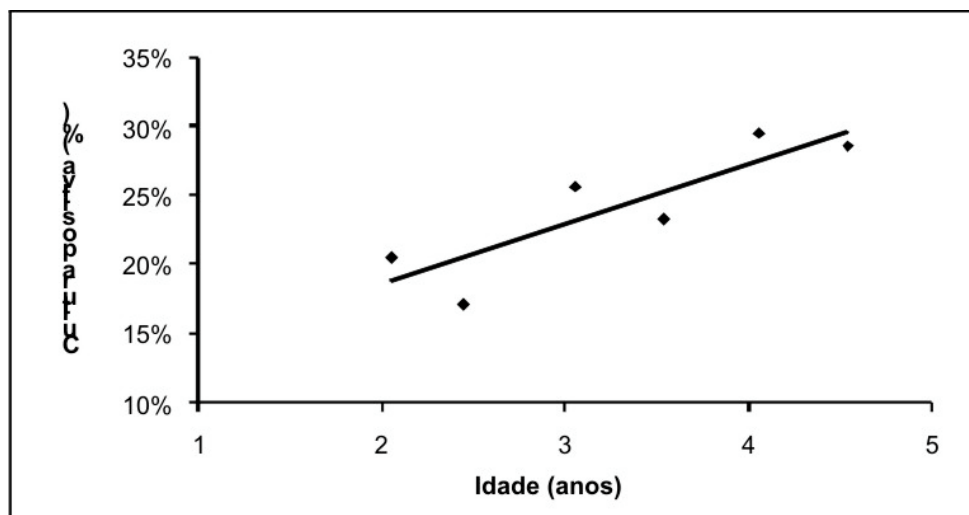


FIGURA 4 - FREQUÊNCIA DE CULTURAS POSITIVAS PARA PA DE ACORDO COM A IDADE NAS 6 AMOSTRAS

FONTE: A autora

Procurou-se avaliar a correlação entre o estado nutricional dos pacientes através do índice de massa corporal (IMC) e a colonização das vias aéreas com PA, conforme a Tabela 4. Não foi encontrada significância estatística para a confirmação da hipótese de que os pacientes com IMC abaixo do normal seriam mais colonizados por PA (teste exato de Fisher). A frequência das colonizações foi semelhante em todos os pacientes, independentemente do IMC.

TABELA 4 - ASSOCIAÇÃO DO STATUS (COLONIZADO OU NÃO) E IMC (NORMAL OU BAIXO) NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE

	IMC	N	Frequência (%)		Valor de p ⁽³⁾
			Colonizado ⁽¹⁾	Não colonizado ⁽²⁾	
Amostra 1	baixo	11	7 (63,6)	4 (36,4)	0,713
	normal	31	22 (71,0)	9 (29)	
Amostra 2	baixo	11	8 (72,7)	3 (27,3)	1
	normal	30	23 (76,7)	7 (23,3)	
Amostra 3	baixo	11	7 (63,6)	4 (36,4)	0,227
	normal	29	24 (82,8)	5 (17,2)	
Amostra 4	baixo	11	8 (72,7)	3 (27,3)	1
	normal	30	21 (70,0)	9 (30)	
Amostra 5	baixo	10	7 (70,0)	3 (30)	1
	normal	28	20 (71,4)	8 (28,6)	
Amostra 6	baixo	9	6 (66,7)	3 (33,3)	1
	normal	29	21 (72,4)	8 (27,6)	

(1) Colonizado = crônicos + intermitentes.

(2) Não colonizado = livres de PA.

(3) Teste exato de Fisher.

Dos cinco pacientes classificados como “crônicos”, dois deles apresentaram IMC abaixo de 15% até a 3.^a coleta de amostra, evoluindo para um IMC normal a partir da 4.^a amostra. Entre os “livres de PA”, dois pacientes apresentaram IMC baixo na

coleta da primeira amostra, evoluindo com IMC normal até o fim do estudo. Dois pacientes apresentaram IMC abaixo de 15% em duas ocasiões consecutivas, normalizando até o final do período de acompanhamento. Todos os pacientes livres apresentaram IMC normal a partir da 5.^a coleta de amostra. Entre os “intermitentes”, sete pacientes iniciaram o estudo com IMC abaixo do normal, sendo que apenas um deles persistiu com IMC baixo durante todo o estudo. Os demais normalizaram o IMC a partir da 2.^a coleta de amostra.

A tabela seguinte (Tabela 5) refere as características demográficas gerais dos pacientes na ocasião das tomadas de amostras simultâneas de orofaringe e sangue. Observa-se que, com o avançar da idade, o peso e a altura das crianças evoluíram normalmente, bem como o IMC. Em média, 11 pacientes (25%) apresentaram IMC abaixo de 15% durante o estudo, e foram observadas exacerbações em 9,5% dos pacientes avaliados.

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE

VARIÁVEL	AMOSTRA 1 (N=44)	AMOSTRA 2 (N=42)	AMOSTRA 3 (N=44)	AMOSTRA 4 (N=44)	AMOSTRA 5 (N=44)	AMOSTRA 6 (N=42)
Idade (meses) ⁽¹⁾	24 ± 1,3	28,8 ± 1,3	36 ± 1,3	42 ± 1,3	48 ± 1,3	54 ± 1,3
Peso (kg) ⁽¹⁾	10,6 ± 4,2	12,1 ± 3,4	13,7 ± 3,4	15 ± 3,7	16,4 ± 3,8	17,4 ± 3,8
Altura (m) ⁽¹⁾	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1 ± 0,1	1 ± 0,1	1 ± 0,1
IMC (kg/m ²) ⁽¹⁾	15,6 ± 1,9	15,9 ± 1,6	15,9 ± 1,6	15,9 ± 1,6	16 ± 1,8	16 ± 1,8
IMC<15% ⁽²⁾	13 (31,0)	10 (24,4)	9 (22,5)	12 (29,3)	11 (28,9)	11 (28,9)
Histórico de exacerbação ⁽²⁾	7 (15,9)	5 (11,4)	3 (6,8)	6 (13,6)	2 (4,5)	2 (4,8)
N.º de pacientes avaliados quanto à exacerbação	(N=37)	(N=39)	(N=41)	(N=38)	(N=42)	(N=40)

(1) Média ± desvio-padrão (DP).

(2) Frequência (%).

Procurou-se avaliar a correlação entre o estado nutricional dos pacientes e a história de exacerbação de sintomas respiratórios avaliada no intervalo entre as coletas das amostras, como mostra a Tabela 6. Não foi encontrada significância estatística para a confirmação da hipótese de que os pacientes com IMC abaixo do normal teriam mais episódios de exacerbação durante o período de acompanhamento do estudo (teste exato de Fisher).

TABELA 6 - ASSOCIAÇÃO DE HISTÓRICO DE EXACERBAÇÃO PULMONAR E IMC (NORMAL OU BAIXO) NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE

	IMC	N	Frequência (%)		Valor de p ⁽¹⁾
			Não exacerbação	Exacerbação	
Amostra 1	baixo	7	6 (85,7)	1 (14,3)	0,405
	normal	35	23 (65,7)	12 (34,3)	
Amostra 2	baixo	5	4 (80)	1 (20)	1
	normal	36	27 (75)	9 (25)	
Amostra 3	baixo	2	1 (50)	1 (50)	0,404
	normal	38	30 (78,9)	8 (21,1)	
Amostra 4	baixo	6	4 (66,7)	2 (33,3)	1
	normal	35	25 (71,4)	10 (28,6)	
Amostra 5	baixo	1	0 (0)	1 (100)	0,289
	normal	37	27 (73)	10 (27)	
Amostra 6	baixo	2	1 (50)	1 (50)	0,501
	normal	36	26 (72,2)	10 (27,8)	

(1) Teste exato de Fisher

No presente estudo foi avaliada a colonização microbiana por meio de culturas de material de orofaringe. O método “padrão-ouro” para verificação da colonização das vias aéreas de pacientes fibrocísticos é a cultura de escarro. Em crianças que não expectoram a alternativa mais apropriada em termos de representatividade seria a coleta de secreções respiratórias através de broncoscopia. O método, porém, é invasivo e frequentemente requer anestesia geral, apesar de apresentar baixo risco quando realizado por pessoal altamente qualificado (RAMSEY, 1996). A positividade de 68,4% das culturas foi suficiente para que os resultados fossem considerados como o padrão-ouro para o presente estudo, tendo em vista a impossibilidade de obtenção de amostras mais representativas.

Como forma de otimizar os resultados das culturas de orofaringe, optou-se neste estudo por realizar nebulização com solução salina hipertônica (SSH) por 10 minutos, imediatamente antes da obtenção do *swab* de orofaringe, com a finalidade de liberar a secreção do trato respiratório inferior. Foram amostradas as tonsilas e a faringe posterior, com base nos estudos de Huang, van Loon e Sheng (1961) e Brien (1985). Os dados obtidos pelo primeiro demonstraram que as culturas de faringe detectam melhor a presença de *Pseudomonas* que *swabs* de nasofaringe, e o segundo conseguiu o maior número de culturas positivas para *S. pyogenes* amostrando ambas tonsilas.

Para a detecção e quantificação de anticorpos anti-PA foi validada uma técnica de ELISA de acordo com Weisner *et al.* (2007). Foram coletadas amostras de sangue de nove voluntários com FC e infecção crônica por PA, com idades variando de 10 a 23 anos, recrutados nos ambulatórios de FC do Hospital de Clínicas da

UFPR. Foram obtidas 40 amostras de sangue de voluntários sadios, com idades variando de 24 a 156 meses (média: 74,9 meses; mediana: 69,5 meses), recrutados em escolas e creches da rede pública, sem evidências de doença pulmonar ou infecção por PA. Estas amostras foram utilizadas para validação da técnica. Os controles sadios apresentaram concentrações de anticorpos IgG com valor médio de 74,65 UA, enquanto os controles positivos apresentaram média de 232,40 UA.

A densidade óptica foi quantificada em 405nm quando a amostra STD atingiu $2,5 A_{405} \pm 10\%$. Se o valor para a amostra N era $0,5 A_{405} \pm 10\%$, os resultados eram aceitos. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) foram calculados para amostras em duplicata. O valor máximo de CV obtido foi 11,7%, enquanto o tolerável pela técnica era de 20% para aceitar o valor médio para a amostra. Era necessário que o valor do blank estivesse abaixo de $1,0 A_{405}$, mas o valor máximo obtido foi $0,217 \pm$.

A correlação entre a idade média dos pacientes em cada visita e a capacidade do teste sorológico para detectar colonização por PA antes da cultura foi investigada. A sensibilidade e a especificidade dos níveis de anticorpos para detecção da presença de PA foram calculadas tomando o resultado das culturas obtidas na mesma ocasião como padrão-ouro, como mostrado na Figura 5.

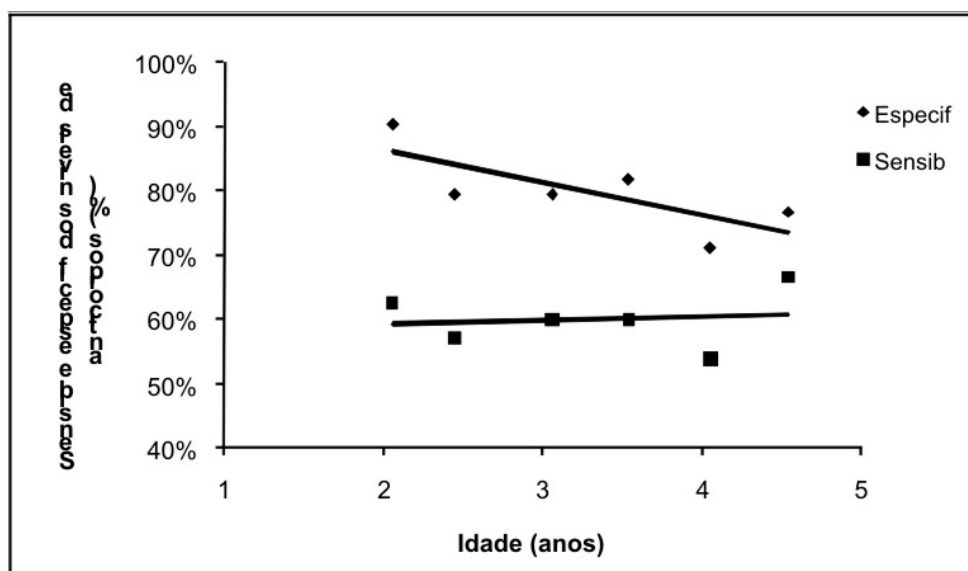


FIGURA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE A MÉDIA DAS IDADES DOS PACIENTES E A CAPACIDADE DO TESTE SOROLÓGICO PARA DETECTAR COLONIZAÇÃO POR PA ANTES DA CULTURA EM CADA VISITA

FONTE: A autora

Houve uma tendência significativa de associação entre a idade e a especificidade dos níveis de IgG, com diminuição dos títulos de anticorpos ao longo do tempo. Não foi encontrada associação entre a sensibilidade do ensaio e a idade dos pacientes. Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados utilizando os pontos de corte sugeridos por curvas ROC construídas para cada momento de tomada das amostras simultâneas de orofaringe e soro. Para avaliação do efeito da idade sobre os índices avaliados (sensibilidade e especificidade), para cada um deles testou-se a hipótese nula de inexistência de correlação com a idade, *versus* a hipótese alternativa de existência de correlação. Na Tabela 7 são apresentados os coeficientes de correlação de Spearman e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 7 - TESTES ESTATÍSTICOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IDADE SOBRE A ESPECIFICIDADE E A SENSIBILIDADE DA SOROLOGIA

	n	COEF. CORRELAÇÃO SPEARMAN	VALOR DE p
Média de idade x especificidade	6	-0,77	0,072
Média de idade x sensibilidade	6	0,06	0,913

Pode-se observar que existe uma tendência à associação significativa entre a média de idade e especificidade. O resultado indica que há uma piora na especificidade da sorologia conforme aumenta a idade do paciente (correlação negativa: -0,77. Em relação à sensibilidade, não existe indicativo de haver associação com a idade do paciente.

Foi determinado o momento em que PA foi isolado pela primeira vez nas culturas durante o período do estudo, e o resultado da sorologia concomitante. A capacidade das concentrações de anticorpos discriminarem entre presença ou ausência de PA foi estimada utilizando curvas ROC. Os melhores pontos de corte para os resultados da sorologia (melhor combinação de sensibilidade e especificidade) foram definidos para cada amostra ajustando as curvas ROC em cada um dos momentos avaliados. Um exemplo de curva ROC ajustada para cada amostra é apresentado na Figura 6.

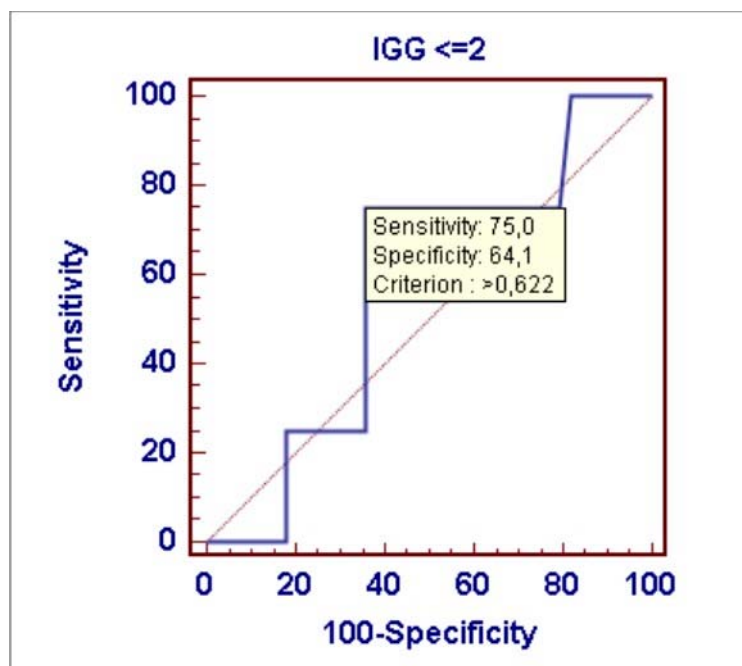


FIGURA 6 - EXEMPLO DE CURVA ROC PARA IDENTIFICAÇÃO DO PONTO DE CORTE DA SOROLOGIA CONSIDERANDO-SE A CULTURA COMO PADRÃO OURO
 FONTE: A autora

Os valores de sensibilidade e especificidade dos pontos de corte sugeridos para todas as amostras são apresentados na Tabela 8. Para avaliar a qualidade do ajuste da curva, foram estimadas as áreas abaixo da curva e o valor de p do teste estatístico. A hipótese nula do teste é que a área sob a curva é igual a 0,5 (o valor do IgG não discrimina entre presença e ausência de PA) e a hipótese alternativa é de que a área é maior do que 0,5 (IgG discrimina em relação à presença ou não de PA).

TABELA 8 - QUALIDADE DO AJUSTE DAS CURVAS ROC PARA DETERMINAR OS PONTOS DE CORTE PARA CADA VISITA

VISITA	1	2	3	4	5	6
Área abaixo da curva	0,764	0,702	0,772	0,844	0,677	0,789
Valor de p	0,012	0,089	0,004	< 0,001	0,057	0,001
Ponto de corte ⁽¹⁾	82,2	140,6	131,4	184,4	176,9	147,5
Sensibilidade (%)	75,0	57,1	60,0	60,0	38,5	58,3
Especificidade (%)	83,9	91,2	89,7	97,0	100,0	93,3

(1) Unidades arbitrárias (UA).

As concentrações de anticorpos anti-PA foram relacionadas à presença da bactéria nas culturas coletadas no mesmo momento e à história de exacerbação avaliada no intervalo entre as coletas destas amostras, como mostra a Tabela 9. Devido à baixa frequência de exacerbações não foi possível aplicar teste estatístico para esta análise.

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IGG ANTI-PA X PRESENÇA DE PA NAS CULTURAS X HISTÓRIA DE EXACERBAÇÃO NA OCASIÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E OROFARINGE

	PONTOS DE CORTE IgG ⁽¹⁾	INTERPRETAÇÃO DA SOROLOGIA	CULTURA PA NEGATIVA	CULTURA PA NEGATIVA COM EXACERBAÇÃO	CULTURA PA POSITIVA	CULTURA PA POSITIVA COM EXACERBAÇÃO
Amostra 1 N=39 ⁽²⁾	82,2	negativa positiva	26 6	4 (15,4) 1 (16,7)	2 5	0 (0) 1 (20,0)
Amostra 2 N=41	140,6	negativa positiva	31 7	4 (12,9) 1 (14,3)	3 0	0 (0) 0 (0)
Amostra 3 N=39	131,4	negativa positiva	26 5	0 (0) 2 (40,0)	4 4	0 (0) 0 (0)
Amostra 4 N=43	184,4	negativa positiva	32 5	4 (12,5) 2 (40,0)	4 2	0 (0) 0 (0)
Amostra 5 N=44	176,9	negativa positiva	32 3	1 (3,1) 0 (0)	7 2	0 (0) 1 (50,0)
Amostra 6 N=42	147,5	negativa positiva	28 5	0 (0) 0 (0)	5 4	1 (20,0) 1 (25,0)

(1) Pontos de corte (*cut off*) ajustados pelas curvas ROC, em unidades arbitrárias.

(2) Total de amostras avaliadas quanto à exacerbação, presença de PA nas culturas e quantificação de anticorpos IgG.

Para comparação do desempenho dos dois métodos utilizados na detecção precoce de PA, foram construídas curvas de tempo para detecção de PA considerando os resultados dos testes sorológicos e microbiológicos (Figura 7). O evento de interesse foi a primeira vez que foi detectada a presença de PA e o tempo considerado foi a idade do paciente na ocasião. Casos que não apresentavam PA durante todo o período de acompanhamento foram censurados e o tempo de seguimento correspondente foi a idade do paciente na última avaliação.

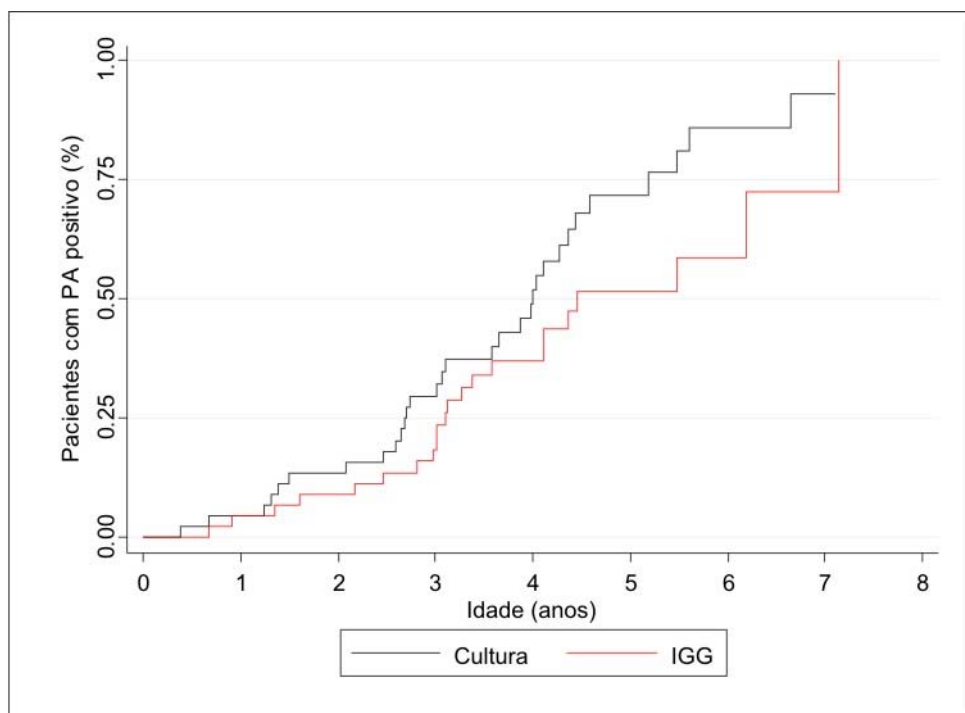


FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DA DETECÇÃO DE PA POR CULTURA OU SOROLOGIA RELACIONADA À IDADE DOS PACIENTES
 FONTE: A autora

Analisando a figura observa-se que na idade 0 nenhum dos pacientes tinha resultado positivo de PA (pela cultura ou pela sorologia). Com o aumento da idade foram aparecendo os casos positivos. Desta forma, no eixo y tem-se a proporção de casos positivos de acordo com a idade (tanto para cultura quanto para sorologia). Por exemplo, na idade de 5 anos aproximadamente 50% dos casos tinham resultado positivo na sorologia e 73% dos casos tinham resultado positivo na cultura.

Pontos de corte para interpretação dos valores de IgG foram definidos construindo curvas ROC para três faixas etárias (até 2 anos, de 2 a 4 anos e maior que 4 anos), para facilitar a verificação da utilização prática da sorologia, considerando a cultura como padrão-ouro. As áreas sob a curva e os valores de p foram estimados para avaliar a qualidade do ajustamento da curva (Figura 8).

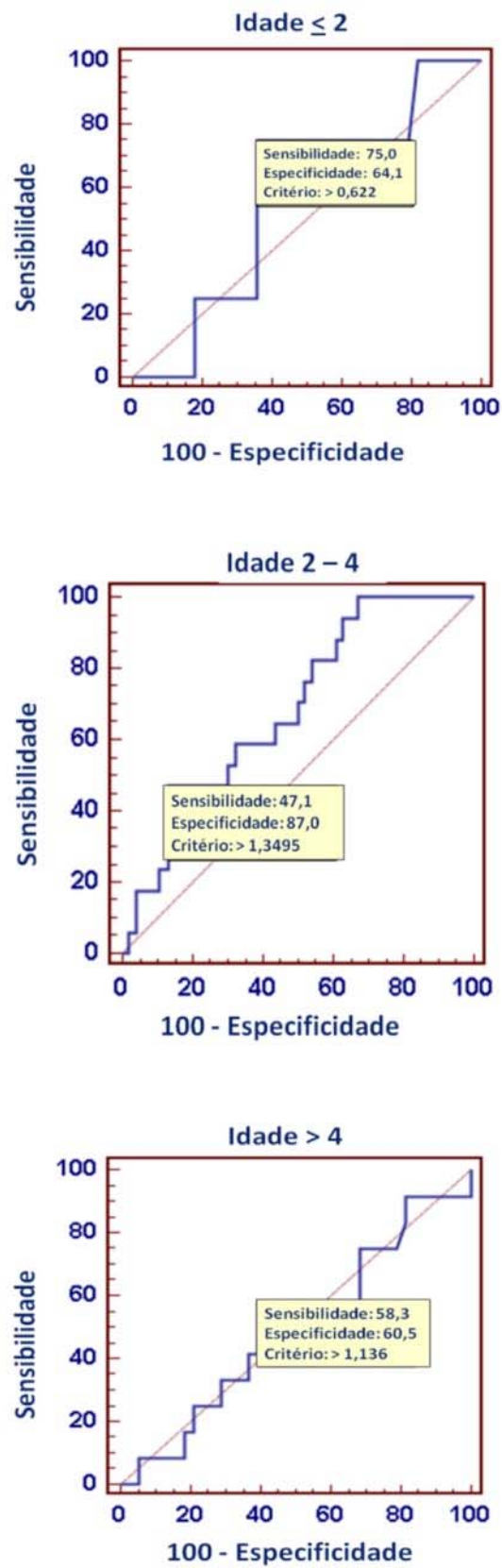


FIGURA 8 - CURVAS ROC PARA DEFINIÇÃO DOS PONTOS DE CORTE PARA A SOROLOGIA EM TRÊS GRUPOS ETÁRIOS DIFERENTES, CONSIDERANDO A CULTURA COMO PADRÃO-OURO

FONTE: A autora

TABELA10 - VALORES INFERIDOS DAS CURVAS ROC POR FAIXA ETÁRIA

FAIXA ETÁRIA	< 2 ANOS	2 – 4 ANOS	> 4 ANOS
Número de pacientes em cada faixa etária	43	63	50
Área abaixo da curva	0,574	0,689	0,510
Valor de p	0,639	0,017	0,919
Valores de IgG associados a PA + ponto de corte sugerido pela curva ROC	> 0,622	> 1,349	> 1,136
Sensibilidade	75,0%	47,1%	58,3%
Especificidade	64,1%	87,0%	60,5%

6 DISCUSSÃO

Apesar do defeito genético determinante da FC resultar em uma variedade de problemas patológicos para o paciente, a manifestação clínica mais evidente, infecção pulmonar crônica por PA, permite que o processo patológico básico da FC possa ser considerado uma doença infecciosa (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002).

O projeto de triagem neonatal para FC de Wisconsin, EUA (*Wisconsin CF Neonatal Screening Project*) ofereceu uma oportunidade única de estudar a correlação longitudinal entre a aquisição e infecção por PA e o desenvolvimento de doença pulmonar em crianças com FC. Os resultados do estudo demonstraram que a progressão da doença pulmonar acelera indubitavelmente após a aquisição de PA (KOSOROK *et al.*, 2001).

Analisando os dados do *CFF Patient Registry* obtidos entre 1995 e 2005, Razvi *et al.* (2009) encontraram uma diminuição da prevalência de infecção por PA de 60,4% para 56,1% nos EUA. No entanto, aumento significativo da incidência ocorreu em crianças com menos de 1 ano de idade e de 2 a 5 anos.

Os resultados do presente estudo demonstraram uma frequência de colonização por PA em 75% dos pacientes, dos quais aproximadamente 15% eram crônicos durante todo o tempo de acompanhamento. A bactéria foi isolada em uma média de 24,3% dos pacientes ao longo do período de acompanhamento. Outros micro-organismos comumente isolados em culturas de amostras respiratórias de pacientes com FC também foram encontrados, dentre eles o mais prevalente foi *S. aureus* (média de 54%). As prevalências de SA e PA foram condizentes com a literatura, porém HI foi isolado em frequência menor que a esperada para a população avaliada (crianças menores de 6 anos), provavelmente devido à demora na utilização de meio seletivo (ACHB), que não estava disponível no laboratório até a metade do período do estudo. A incidência de bactérias do complexo *B. cepacia* foi surpreendente (média 6,5%), pois estudos internacionais relatam maior prevalência desta bactéria em pacientes mais velhos, geralmente após o estabelecimento da infecção crônica por PA (FOWERAKER, 2009). Entre as culturas em que foram isolados múltiplos micro-organismos, as associações de bactérias envolvendo SA ou PA foram as mais prevalentes; dados de literatura internacional sobre associação de micro-organismos

são escassos, portanto este achado do presente estudo pode ser relevante. Leveduras foram isoladas intermitentemente, e *Aspergillus* spp. em apenas uma cultura de dois pacientes.

Estudos nacionais avaliando pacientes com FC de diferentes faixas etárias relatam frequências diversas dos mesmos micro-organismos analisados no presente estudo, com PA e SA como bactérias prevalentes em qualquer faixa etária. As diferenças entre as metodologias utilizadas nas culturas (uso ou não de meios seletivos, métodos fenotípicos ou moleculares para identificação bacteriana) podem ser responsáveis pela diversidade dos resultados (ALVAREZ *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2003; MATOS, 2005).

Dados do relatório anual de 2009 divulgado pela *Cystic Fibrosis Foundation* revelam prevalência semelhante à encontrada neste estudo para as duas bactérias mais prevalentes (SA e PA) em pacientes na mesma faixa etária. *S. aureus* foi a bactéria mais prevalente na faixa etária de 2 a 5 anos, com frequência de aproximadamente 65%. *P. aeruginosa* foi isolada em aproximadamente 25% dos pacientes (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2009).

O estado nutricional adequado dos pacientes com FC é fundamental para o tratamento. A manutenção dos padrões normais de curva de crescimento em crianças com FC requer o gerenciamento de sintomas gastrointestinais e respiratórios, ingestão energética e de nutrientes, além de aspectos psicossociais e financeiros. A desnutrição resulta da discrepância entre as necessidades energéticas e de micronutrientes e a ingestão de alimentos modificada pela má absorção (STALLINGS *et al.*, 2008). Em estudo realizado no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, foram avaliados nutricionalmente todos os pacientes atendidos no ambulatório de FC pelo período de 3,5 anos. A amostra era constituída de 74 pacientes com idades entre 6 meses e 18 anos, e os resultados apresentados indicaram desnutrição leve em geral. Houve correlação significativa entre estado nutricional melhor e menor envolvimento pulmonar (ADDE; RODRIGUES; CARDOSO, 2004).

O estado nutricional dos pacientes ao longo do presente estudo permaneceu estável, com 11 pacientes (25%) apresentando IMC abaixo de 15% intermitentemente. Exacerbação dos sintomas respiratórios foi observada em 4 pacientes durante todo o período, porém a análise da associação entre colonização por PA ou exacerbação de sintomas com o estado nutricional não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Algumas particularidades devem ser consideradas na análise dos dados obtidos no presente estudo. Os pacientes recrutados foram todos diagnosticados pela triagem neonatal e, assim que confirmado o diagnóstico de FC, começaram a ser acompanhados ambulatorialmente por pessoal multidisciplinar altamente especializado (médicos pneumologistas, nutricionistas, fisioterapeutas, microbiologistas). Assim sendo, aos primeiros sinais de exacerbação de sintomas respiratórios, desnutrição ou infecção, medidas intervencionistas foram aplicadas. Isto pode explicar, em parte, a baixa incidência de exacerbações respiratórias, o estado nutricional adequado da maioria dos pacientes, e a baixa prevalência de pacientes cronicamente colonizados por PA.

No presente trabalho foram utilizadas culturas de orofaringe para avaliar o *status* microbiológico dos pacientes. Apesar de vários estudos terem verificado o baixo valor preditivo negativo (VPN) deste tipo de amostra (RAMSEY *et al.*, 1991; ARMSTRONG *et al.*, 1996; ROSENFELD *et al.*, 1999; BURNS *et al.*, 2001), procurou-se utilizar a prática mais frequente e viável de coleta de amostras respiratórias em crianças pequenas. Em estudo que comparou os resultados de culturas de amostras broncoscópicas e de orofaringe coletadas no mesmo momento, o valor preditivo positivo (VPP) para detecção da presença de PA e SA demonstrou baixa frequência de resultados falso-positivos (RAMSEY *et al.*, 1991). Foram avaliados 43 pacientes com idades variando de 4 meses a 25 anos (média $8,2 \pm 6,9$ anos), em bom estado respiratório, e verificou-se que a alta frequência de culturas negativas não estava relacionada ao uso prévio de antibióticos; ao contrário, a sensibilidade das culturas de orofaringe para detecção de PA foi maior em pacientes tratados com antibióticos antipseudomonas. Os autores concluíram que, de maneira geral, uma cultura positiva para PA ou SA previa confiavelmente a presença dos patógenos no trato respiratório inferior, enquanto um resultado negativo não a excluía.

Em estudo posterior avaliando uma população mais semelhante à do presente trabalho, de 75 crianças com média de idade de 17 meses (1-52 meses), Armstrong *et al.* (1996) demonstraram que, apesar da sensibilidade das culturas de orofaringe para detecção dos principais patógenos (PA, SA e HI) ter sido baixa (71%), uma cultura negativa indicava uma probabilidade de 97% dos patógenos estarem ausentes.

Rosenfeld *et al.* (1999) delinearam um estudo envolvendo crianças muito pequenas, “pré-expectorantes”, de três centros de atendimento de FC, com o intuito de verificar se as culturas de orofaringe eram um substituto válido para as culturas de trato respiratório inferior. Concluíram que as culturas de faringe em crianças FC muito pequenas “possuíam alta especificidade e valor preditivo negativo para PA nas vias aéreas inferiores, mas pouca sensibilidade e valor preditivo positivo”.

No presente estudo os resultados obtidos com as amostras de orofaringe demonstraram uma positividade das culturas de 68,4% para os patógenos pesquisados, embora outros tipos mais adequados de material biológico pudessem fornecer um índice maior. A incapacidade de expectoração das crianças pequenas levou à aceitação de amostras de orofaringe como alternativa viável de obtenção de amostras respiratórias no ambulatório estudado.

A detecção precoce da colonização por PA em crianças com FC é um dos principais objetivos do acompanhamento microbiológico rotineiro destes pacientes. Com o advento do diagnóstico da doença através de programas de triagem neonatal, populações cada vez mais jovens tornaram-se alvo de estudos para determinar estratégias de detecção dos primeiros sinais da presença da bactéria (FARRELL; GOVAN, 2006).

Embora os resultados obtidos com diferentes antígenos não sejam sempre conclusivos, a maioria dos autores considera que a pesquisa de anticorpos anti-PA seja ferramenta útil no monitoramento da colonização pela bactéria. Como este método nunca havia sido aplicado no Estado do Paraná, procurou-se no presente estudo pesquisar anticorpos anti-PA nos pacientes recrutados como auxílio ao diagnóstico precoce da infecção. Foi utilizado como antígeno o lipopolissacáride extraído de PA, por ser de relativamente fácil obtenção e armazenamento, além de apresentar desempenho satisfatório conforme trabalhos da literatura internacional que utilizaram este antígeno (ARSENAULT *et al.*, 1991; SCHAAD *et al.*, 1990; BRAUNER *et al.*, 1993; FOMSGAARD *et al.*, 1993; WEISNER *et al.*, 2007). Uma técnica de ELISA foi validada e padronizada para o antígeno utilizado. Os resultados obtidos com controles saudáveis e portadores de colonização crônica por PA viabilizaram a utilização da técnica para a pesquisa de anticorpos anti-LPS de PA.

A pesquisa de anticorpos anti-PA tem sido utilizada para demonstrar infecção crônica em pacientes com FC (ARMSTRONG *et al.*, 1996; DORING; HOIBY, 1983),

embora isto possa ter limitada relevância, uma vez que a infecção crônica geralmente é diagnosticada clinicamente sem a necessidade de marcadores séricos. Anticorpos são potencialmente mais úteis no auxílio ao diagnóstico e gerenciamento da infecção precoce por PA (RATJEN *et al.*, 2007). Um estudo pesquisando anticorpos anti-PA no soro de indivíduos normais e pacientes colonizados com PA (HOIBY, 1977) demonstrou que a prevalência dos anticorpos aumentou gradualmente com a idade na população normal. Os resultados do presente estudo indicaram uma correlação negativa entre a idade e a especificidade das concentrações de IgG, o que pode ser explicado pelo aumento da exposição a antígenos de PA com o avançar da idade, como foi verificado no estudo de Hoiby *et al.* (1977).

As diferenças entre as metodologias utilizadas nos diversos trabalhos analisados, bem como entre os pontos de corte considerados para determinar a positividade dos dados obtidos, podem explicar os resultados muitas vezes conflitantes. Os pontos de corte estabelecidos pelos kits comerciais são baseados em um número limitado de pacientes cronicamente infectados que podem não ser representativos da população geral de pacientes com FC (RATJEN *et al.*, 2007).

Dois artigos independentes, publicados simultaneamente, apresentaram conclusões contrastantes, confirmando a controvérsia que ainda paira sobre a utilidade dos testes sorológicos para detecção precoce de infecção por PA na FC. Os referidos estudos utilizaram o mesmo teste comercial de ELISA, disponível atualmente na Europa e contendo três diferentes antígenos (protease alcalina, elastase e exotoxina A), porém pontos de corte sorológicos diferentes foram considerados para definição da positividade dos resultados. Kappler *et al.* (2006) usaram o valor de ponto de corte recomendado pelo fabricante, enquanto Tramper-Stranders *et al.* (2006) consideraram pontos de corte ajustados por curvas ROC. Os dados obtidos por Kappler *et al.* (2006) mostraram que resultados positivos significavam com quase certeza colonização por PA, e resultados negativos ausência de PA com crescente probabilidade com o avançar da idade. Por sua vez, Tramper-Stranders *et al.* (2006) concluíram que, apesar dos testes terem sido sensíveis para detectar infecção crônica, foram falhos em detectar colonização precoce em crianças, “ênfatizando a necessidade de se continuar confiando nas culturas”.

Hayes *et al.* (2010) estudaram 69 crianças diagnosticadas pela triagem neonatal durante 6 anos. Compararam a cultura de amostras respiratórias (swabs de

orofaringe ou escarro), como o método padrão ouro, com sorologia por ELISA utilizando lisado celular, exotoxina A purificada e toxoide elastase como antígenos para detectar anticorpos contra PA. Os pontos de corte para positividade foram ajustados por curvas ROC. Os autores concluíram que a sorologia permitiu um diagnóstico seis meses mais precoce da colonização por PA que a cultura, e que pontos de corte ajustados por curvas ROC para cada faixa etária resultaram em melhor detecção de infecções respiratórias por PA, concomitantes ou futuras, do que um único valor de ponto de corte para todas as idades.

Com o objetivo de determinar os melhores pontos de corte para a discriminação entre presença e ausência de PA pelo teste sorológico utilizado no presente estudo, foram ajustadas curvas ROC para cada uma das amostras de soro analisadas. Pelos resultados concluiu-se que os valores de IgG discriminaram entre presença e ausência de PA, uma vez que os valores obtidos para as áreas sob as curvas foram superiores a 0,5 confirmando a hipótese alternativa (a hipótese nula era de que os resultados da sorologia não discriminariam entre presença e ausência de PA).

Winnie e Cowan (1991) avaliaram a correlação entre sorologia para PA e doença pulmonar obstrutiva em pacientes com FC. Pacientes não colonizados com PA apresentaram baixas concentrações de anticorpos e manifestações mais leves da doença pulmonar. Foi observada, também, correlação inversa entre os títulos de anticorpos e a função pulmonar em pacientes crônicos. West *et al.* (2002), estudando crianças com FC, sugeriram que a sorologia para PA, em conjunto com radiografias de pulmão, poderiam ser utilizadas para o diagnóstico precoce da infecção por PA em crianças, pois obtiveram evidências radiográficas de lesão pulmonar irreversível 5,8 meses antes da primeira cultura positiva por PA. Num período similar verificaram aumento de anticorpos antiexotoxina A. No estudo de Garcia (2006) foi observada correlação entre concentrações mais elevadas de anticorpos anti-PA e piores resultados dos testes de função pulmonar, indicando deterioração da função pulmonar. No presente estudo a baixa frequência de exacerbações pulmonares não permitiu avaliar estatisticamente a correlação entre o aumento das concentrações de anticorpos e exacerbações durante o período de acompanhamento.

Como parte do projeto pioneiro de triagem neonatal para FC, o “*Wisconsin CF Neonatal Screening Project*”, West *et al.* (2002) estudaram a correlação longitudinal entre indicadores clínicos de infecção por PA, detecção de PA por culturas de

orofaringe, e a resposta imune em 68 pacientes diagnosticados portadores de FC pela triagem neonatal. Os antígenos utilizados no estudo foram: um lisado celular derivado de diferentes cepas de PA (PAO1, FRD e UWP100), exotoxina A purificada e um toxoide de elastase preparado a partir de elastase purificada. Os autores observaram que as infecções por PA ocorriam de 6 a 12 meses antes da bactéria ser detectada nas culturas, e que o acompanhamento longitudinal dos títulos de anticorpos e dos sinais clínicos poderia ser útil no cuidado de bebês e crianças pequenas com FC.

No presente estudo foi desenvolvida *in house* uma técnica de ELISA utilizando como antígeno o LPS extraído de PA. A dificuldade e o custo da obtenção de testes comerciais para detecção de anticorpos anti-PA motivou a implementação da técnica. Os resultados satisfatórios obtidos com o antígeno de LPS no Laboratório Central de Saúde Pública de Londres, no Reino Unido, e a disponibilização da técnica de extração e purificação do LPS despertaram o interesse do grupo do Hospital de Clínicas da UFPR envolvido no atendimento de pacientes com FC, em testar a nova metodologia.

Pesquisadores do Grupo Escandinavo de Estudos sobre FC (*Scandinavian CF Study Consortium*) quantificaram anticorpos anti-PA por três testes sorológicos diferentes (dois por ELISA e um por imunoeletroforese cruzada) e concluíram que os três foram igualmente “informativos”. A alta sensibilidade dos testes permitiu caracterizar pacientes com resultados negativos como livres de infecção crônica por PA e, devido à especificidade dos testes, sugeriram que deve ser considerado iniciar o tratamento com antibióticos com base somente nos resultados da sorologia em casos selecionados. Existe uma “janela de oportunidade” de supressão e possível erradicação da infecção inicial por PA tornando a quantificação de anticorpos anti-PA uma ferramenta útil (PRESSLER *et al.*, 2009).

Um estudo caso-controle avaliou o aumento de anticorpos anti-PA como fator de risco para o desenvolvimento de infecção pulmonar crônica. Os resultados demonstraram que as concentrações de anticorpos em constante elevação poderiam ter valor diagnóstico potencial e poderiam ser utilizadas como uma ferramenta prognóstica para a identificação do grupo de pacientes com FC sob risco de estabelecimento de infecção crônica por PA (PRESSLER *et al.*, 2006).

Milagres *et al.* (2009) quantificaram anticorpos em pacientes com FC do Estado do Rio de Janeiro, utilizando antígenos de lisado celular de PA e PcrV recombinante, uma proteína do sistema de secreção tipo III (TTSS), que é um

mecanismo usado por patógenos gram-negativos para liberar fatores anti-hospedeiro. Determinaram, também, as concentrações de anticorpos de um grupo controle constituído de pacientes sem FC, para funcionarem como valores normais de referência. Anticorpos anti-PA estavam presentes em baixas concentrações no grupo controle, e a resposta sorológica contra a proteína recombinante forneceu valores mais baixos que contra o lisado celular, implicando num poder discriminatório melhor da PcrV para diferenciar entre a resposta sorológica do grupo controle do grupo de pacientes com FC. Outro achado importante do estudo foi a possibilidade de detectar a colonização por PA num tempo médio de 21 meses antes do isolamento da bactéria utilizando ambos antígenos. Os resultados indicaram uma resposta imune precoce ao TTSS, uma vez que crianças menores de 5 anos de idade apresentaram uma elevada resposta sorológica contra a PcrV, que também foi mais elevada que a resposta contra o lisado celular.

Nesta pesquisa os resultados obtidos foram satisfatórios para as crianças muito pequenas, apresentando sensibilidade de 75% e especificidade de 64% na faixa etária menor que 2 anos. Para a faixa etária de 2 a 4 anos, o teste sorológico, apesar de apresentar sensibilidade mais baixa (47,1%), mostrou ser relativamente específico (87%), além de revelar aumento significativo das concentrações de anticorpos antes das culturas se tornarem positivas para PA. Na faixa etária acima de 4 anos o teste não se revelou suficientemente sensível e específico para detectar a colonização por PA (S=58,3%, E=60,5%). A dificuldade de obtenção de kits comerciais impossibilitou a utilização de diferentes antígenos para avaliar comparativamente o desempenho do antígeno de LPS. A associação de testes aumenta a positividade da sorologia, como demonstrado em vários estudos, aumentando a probabilidade de detecção precoce da infecção.

Os estudos sobre sorologia para detecção de PA enfatizam a determinação da sensibilidade e da especificidade dos testes em relação à colonização das vias aéreas pela bactéria (MILAGRES *et al.*, 2008). Os pesquisadores concordam que “é importante detectar PA precocemente em pacientes fibrocísticos e iniciar a antibioticoterapia, a fim de evitar a colonização crônica e a progressão da infecção”. O aumento dos títulos de anticorpos específicos anti-PA pode ser considerado como um sinal precoce da presença da bactéria nas vias aéreas, e representa uma oportunidade para o diagnóstico e a erradicação da bactéria (FARRELL; GOVAN, 2006). A avaliação

conjunta dos resultados dos testes sorológicos e das culturas de amostras respiratórias tem-se revelado mais confiável que uma ou outra metodologia separadamente, fato que foi observado no presente estudo. Em crianças maiores de 4 anos, por exemplo, as culturas forneceram resultados positivos para PA antes da sorologia, enquanto em crianças menores a detecção por ambas metodologias foi praticamente concomitante. A segurança e a confiança inerentes ao isolamento bacteriano, além da possibilidade de testar a bactéria quanto à suscetibilidade a antimicrobianos, assegura que o método tradicional de diagnóstico microbiológico continue sendo utilizado no gerenciamento dos pacientes com FC.

Método molecular para detectar PA (reação em cadeia da polimerase – PCR), juntamente com métodos sorológicos e microbiológicos, demonstrou ser um fator coadjuvante significativo para a detecção precoce da infecção por PA, apesar de estudos prospectivos serem necessários para confirmar esta hipótese (DA SILVA FILHO, 2007). O fato de métodos diretos (moleculares ou microbiológicos) terem oferecido maior sensibilidade para detectar a presença da bactéria que os métodos indiretos corrobora o achado deste estudo em que a sorologia não foi capaz de detectar a infecção por PA antes da cultura em todos os pacientes estudados.

A presente pesquisa foi um estudo de coorte prospectivo com diferentes etapas de acompanhamento que permitiu verificar que, apesar da sorologia não ser capaz de detectar a infecção por PA antes da cultura, apresentou uma alta especificidade principalmente em crianças abaixo de 4 anos. A cultura de orofaringe é uma alternativa para estes pacientes que necessitam ser acompanhados desde a primeira infância, pois é uma maneira de avaliar a microbiota das vias aéreas utilizando um material que pode ser coletado de forma não invasiva. A fibrose cística é uma doença multifacetada e nesse trabalho foi possível visualizar os múltiplos encaminhamentos futuros. Pretende-se na continuidade avaliar a epidemiologia molecular dos isolados de PA, bem como identificar molecularmente os isolados do complexo *B. cepacia* e os demais bacilos gram-negativos não-fermentadores encontrados. O diagnóstico laboratorial pode ajudar de modo direto no manejo dos pacientes com FC prevenindo a infecção crônica e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

7 CONCLUSÕES

Durante o período do estudo, 75% dos pacientes apresentaram colonização por PA, dos quais 15% eram crônicos já no início do acompanhamento. Nenhum paciente livre de PA no início do estudo adquiriu a bactéria de maneira crônica.

Dentre as culturas em que foram isolados múltiplos micro-organismos, associação de bactérias envolvendo SA ou PA foi a mais prevalente. Leveduras foram isoladas intermitentemente e consideradas contaminantes; foram isolados *Aspergillus* spp. em apenas uma cultura de dois pacientes, que não se confirmaram nas culturas posteriores, indicando ausência de significância deste achado.

P. aeruginosa apresentou-se com prevalência semelhante à relatada no relatório anual de 2009 divulgado pela *Cystic Fibrosis Foundation* para pacientes na mesma faixa etária.

Não foi possível correlacionar colonização por PA com o estado nutricional. A análise não apresentou diferença estatisticamente significativa quanto à presença de PA nos pacientes com IMC normal ou baixo.

Devido à baixa frequência de exacerbações, não foi possível avaliar a associação entre o estado nutricional e exacerbações do quadro pulmonar dos pacientes avaliados.

As culturas de orofaringe forneceram resultados satisfatórios quanto ao isolamento de PA e SA, com positividade alta para os dois patógenos mais prevalentes no tipo de população estudada.

O teste de ELISA *in house* implementado para ser avaliado no presente estudo mostrou-se reprodutível, confiável e de relativamente fácil execução.

Os resultados do presente estudo indicaram uma correlação negativa entre a idade e a especificidade das concentrações de anticorpos IgG anti-PA na detecção da colonização pela bactéria, o que pode ser explicado pelo aumento da exposição a antígenos de PA com o avançar da idade, verificado em indivíduos normais.

As curvas ROC ajustadas para cada uma das amostras de soro analisadas forneceram resultados satisfatórios para a discriminação entre presença e ausência de PA.

A baixa frequência de exacerbações pulmonares verificada no estudo não permitiu avaliar estatisticamente a correlação entre o aumento das concentrações de anticorpos e exacerbações durante o período de acompanhamento.

O método laboratorial mais eficaz para o diagnóstico precoce da infecção pulmonar por PA nos pacientes estudados foi a cultura de orofaringe. A utilização do LPS purificado de PA como antígeno demonstrou soroconversão significativa anteriormente à cultura somente na faixa etária entre 2 e 4 anos de idade, indicando que o método sorológico utilizado não foi capaz de detectar a infecção por PA antes da cultura em todos os pacientes estudados. Entretanto, o uso concomitante de métodos tradicionais bacteriológicos (cultura) e sorológicos pode contribuir para o diagnóstico precoce da presença de PA em crianças pequenas incapazes de obter amostras respiratórias ideais para o isolamento de PA.

REFERÊNCIAS

- ADDE, F. V.; RODRIGUES, J. C.; CARDOSO, A. L. Seguimento nutricional de pacientes com fibrose cística: papel do aconselhamento nutricional. **J Pediatr**, v.80, n.6, p.475-482, 2004.
- ALVAREZ, A. E.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J. D. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J Pediatr**, v.80, n.5, p.371-379, 2004.
- ARMSTRONG, D. S.; GRIMWOOD, K.; CARLIN, J. B.; CARZINO, R.; OLINSKY, A.; PHELAN, P. D. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.21, n.5, p.267-275, 1996.
- ARMSTRONG, D. S.; NIXON, G. M.; CARZINO, R.; BIGHAM, A.; CARLIN, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GRIMWOOD, K. Detection of a wide spread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. **Am J Respir Crit Care Med**, v.166, n.7, p.983-987, 2002.
- ARSENAULT, T. L. H.; HUGHES, D. W.; MacLEAN, D. B.; SZAREK, W. A.; KROPINSKI, A. M. B.; LAM, J. S. Structural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. **Can J Chem**, v.69, p.1273-1280, 1991.
- BILLARD-POMARES, T. S.; HERWEGH, S.; WIZLA-DERAMBURE, N.; TURCK, D.; COURCOL, R.; HUSSON, M. O. Application of quantitative PCR to the diagnosis and monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in 5-18-year-old cystic fibrosis patients. **J Med Microbiol**, v.60, n.2, p.157-161, 2011.
- BRAUNER, A.; CRYZ, S. J.; GRANSTRÖM, M.; HANSON, H. S.; LÖFSTRAND, L.; STRANDVIK, B.; WRETLIND, B. Immunoglobulin G antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and exotoxin A in patients with cystic fibrosis or bacteremia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.12, n.6, p.430-436, 1993.
- BRETT, M. M.; GHONEIM, A. T. M.; LITTLEWOOD, J. M. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, v.61, n.11, p.1114-1120, 1986.

BRETT, M. M.; GHONEIM, A. T. M.; LITTLEWOOD, J. M. Prediction and diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a follow-up study. **J Clin Microbiol**, v.26, n.8, p.1565-1570, 1988.

BRIEN, J. H.; BASS, J. W. Streptococcal pharyngitis: optimal site for throat culture. **J Pediatr**, v.106, n.5, p.781-783, 1985.

BURKE, V.; ROBINSON, J. O.; RICHARDSON, C. J.; BUNDELL, C. S. Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Pathology**, v.23, n.2, p.145-148, 1991.

BURNS, J. L.; GIBSON, R. L.; McNAMARA, S.; YIM, D.; EMERSON, J.; ROSENFELD, M.; HIATT, P.; McCOY, K.; CASTILE, R.; SMITH, A. L.; RAMSEY, B. W. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v.83, n.3, p.444-452, 2001.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução n.º 196 de 10 de outubro de 1996**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1996.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2008**, Bethesda, Maryland, USA

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2009**. Bethesda, Maryland, USA: Cystic Fibrosis Foundation.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. **Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group**. Kent: Cystic Fibrosis Trust, 2010.

DA SILVA FILHO, L. V.; TATENO, A. F.; VELLOSO, L. de F.; LEVI, J. E.; FERNANDES, S.; BENTO, C. N.; RODRIGUES, J. C.; RAMOS, S. R. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. **Pediatr Pulmonol**, v.37, n.6, p.537-547, 2004.

DA SILVA FILHO, L. V.; TATENO, A. F.; MARTINS, K. M.; AZZUZ CHERNISHEV, A. C.; GARCIA, D. de O.; HAUG, M.; MEISNER, C.; RODRIGUES, J. C.; DÖRING, G. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.42, n.10, p.938-944, 2007.

DELLON, E. P.; DONALDSON, S. H.; JOHNSON, R.; DAVIS, S. D. Safety and tolerability of inhaled hypertonic saline in young children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.43, n.11, p.1100-1106, 2008.

DORING, G.; HOIBY, N. Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. **Infect Immun**, v.42, n.1, p.197-201, 1983.

EQUI, A. C.; PIKE, S. E.; DAVIES, J.; BUSH, A. Use of cough swabs in a cystic fibrosis clinic. **Arch Dis Child**, v.85, n.5, p.438-439, 2001.

FARRELL, P. M.; GOVAN, J. R. W. *Pseudomonas* serology: confusion, controversy, and challenges. **Thorax**, v.61, n.8, p.645-647, 2006.

FOMSGAARD, A.; HØIBY, N.; SHAND, G. H.; CONRAD, R. S.; GALANOS, C. Longitudinal study of antibody response to lipopolysaccharides during chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. **Infect Immun**, v.56, n.9, p.2270-2278, 1988.

FOMSGAARD, A.; CONRAD, R. S.; GALANOS, C.; SHAND, G. H.; HØIBY, N. Comparative immunochemistry of lipopolysaccharides from typable and polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.26, n.5, p.821-826, 1988.

FOMSGAARD, A.; SHAND, G. H.; FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C.; CONRAD, R. S.; KRONBORG, G.; HØIBY, N. Antibodies from chronically infected cystic fibrosis patients react with lipopolysaccharides extracted by new micromethods from all serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. **APMIS**, v.101, n.2, p.101-112, 1993.

POWERAKER, J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. **Br Med Bull**, v.89, n.93-110, 2009.

GARCIA, D. **Avaliação da resposta de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* e sua importância no diagnóstico laboratorial da infecção pulmonar em pacientes com fibrose cística**. 88p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.168, n.8, p.918-951, 2003.

GILLIGAN, P. Respiratory Cultures from Cystic Fibrosis Patients. In: ISENBERG, H. D. (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington, DC: ASM Press, 2010. p.3.11.3.1-3.11.3.9.

GILLIGAN, P. H.; KISKA, D. L.; APPLEMAN, M. D. **Cumitech 43, Cystic Fibrosis Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2006.

GOVAN, J. R.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol Rev**, v.60, n.3, p.539-574, 1996.

GRANSTROM, M.; ERICSSON, A.; STRANDVIK, B.; WRETLIND, B.; PAVLOVSKIS, O. R.; BERKA, R.; VASIL, M. L. Relation between antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins and colonization/infection in patients with cystic fibrosis. **Acta Paediatr Scand**, v.73, n.6, p.772-777, 1984.

GRZYBOWSKI, J.; TRAFNY, E. A.; WREMBEL-WARGOCKA, J.; PATZER, J.; DZIERZANOWSKA, D.; ZAWISTOWSKA-MARCINIAK, I.; KŁOS, M. Amount, avidity, and specificity of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in normal human sera. **J Clin Microbiol**, v.27, n.6, p.1367-1371, 1989.

HANCOCK, R. E.; MUTHARIA, L. M.; CHAN, L.; DARVEAU, R. P.; SPEERT, D. P.; PIER, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. **Infect Immun**, v.42, n.1, p.170-177, 1983.

HANCOCK, R. E. W.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resist Updat**, v.3, n.4, p.247-255, 2000.

HAUSER, A. R.; JAIN, M.; BAR-MEIR, M.; MCCOLLEY, S. A. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v.24, n.1, p.29-70, 2011.

HAYES JR., D.; FARRELL, P. M.; LI, Z.; WEST, S. E. *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. **Pediatr Pulmonol**, v.45, n.1, p.55-61, 2010.

HENRY, D. A.; SPEERT, D. P. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2011. p.677-691.

HO, S. A.; BALL, R.; MORRISON, L. J.; BROWNLEE, K. G.; CONWAY, S. P. Clinical value of obtaining sputum and cough swab samples following inhaled hypertonic saline in children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.38, n.1, p.82-87, 2004.

HOIBY, N.; FLENSBORG, E. W.; BECK, B.; FRIIS, B.; JACOBSEN, S. V.; JACOBSEN, L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. **Scand J Respir Dis**, v.58, n.2, p.65-79, 1977.

HOIBY, N. Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in serum from normal persons and patients colonized with mucoid or non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: results obtained by crossed immunoelectrophoresis. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v.85C, n.2, p.142-148, 1977.

HOLLSING, A. E.; GRANSTRÖM, M.; VASIL, M. L.; WRETLIND, B.; STRANDVIK, B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.25, n.10, p.1868-1874, 1987.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1994.

HUANG, N. N.; VAN LOON, E. L.; SHENG, K. T. The flora of the respiratory tract of patients with cystic fibrosis of the pancreas. **J Pediatr**, v.59, p.512-521, 1961.

JAGGER, K. S.; ROBINSON, D. L.; FRANZ, M. N.; WARREN, R. L. Detection by enzyme-linked immunosorbent assays of antibody specific for *Pseudomonas* proteases and exotoxin A in sera from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v.15, n.6, p.1054-1058, 1982.

JONES, A. M.; WEBB, A. K.; GOVAN, J. R.; HART, C. A.; WALSHAW, M. J. *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection in cystic fibrosis. **Lancet**, v.359, n.9305, p.527-528, 2002.

JUNG, A.; KLEINAU, I.; SCHÖNIAN, G.; BAUERNFEIND, A.; CHEN, C.; GRIESE, M.; DÖRING, G.; GÖBEL, U.; WAHN, U.; PAUL, K. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. **Eur Respir J**, v.20, n.6, p.1457-1463, 2002.

KABRA, S. K.; ALOK, A.; KAPIL, A.; AGGARWAL, G.; KABRA, M.; LODHA, R.; PANDEY, R. M.; SRIDEVI, K.; MATHEWS, J. Can throat swab after physiotherapy replace sputum for identification of microbial pathogens in children with cystic fibrosis? **Indian J Pediatr**, v.71, n.1, p.21-23, 2004.

KAPPLER, M.; KRAXNER, A.; REINHARDT, D.; GANSTER, B.; GRIESE, M.; LANG, T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Thorax**, v.61, n.8, p.684-688, 2006.

KLINGER, J. D.; STRAUS, D. C.; HILTON, C. B.; BASS, J. A. Antibodies to proteases and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: Demonstration by radioimmunoassay. **J Infect Dis**, v.138, n.1, p.49-58, 1978.

KOSOROK, M. R.; ZENG, L.; WEST, S. E.; ROCK, M. J.; SPLAINGARD, M. L.; LAXOVA, A.; GREEN, C. G.; COLLINS, J.; FARRELL, P. M. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **Pediatr Pulmonol**, v.32, n.4, p.277-287, 2001.

LAM, M. Y. C.; McGROARTY, E. J.; KROPINSKI, A. M.; MacDONALD, L. A.; PEDERSEN, S. S.; HØIBY, N.; LAM, J. S. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v.27, n.5, p.962-967, 1989.

LEE, T. W. R.; BROWNLEE, K. G.; CONWAY, S. P.; DENTON, M.; LITTLEWOOD, J. M. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros**, v.2, n.1, p.29-34, 2003.

LI, Z.; KOSOROK, M. R.; FARRELL, P. M.; LAXOVA, A.; WEST, S. E.; GREEN, C. G.; COLLINS, J.; ROCK, M. J.; SPLAINGARD, M. L. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. **JAMA**, v.293, n.5, p.581-588, 2005.

LINKER, A.; JONES, R. S. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. **J Biol Chem**, v.241, n.16, p.3845-3851, 1966.

LIPUMA, J. J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v.23, n.2, p.299-323, 2010.

LIPUMA, J. J.; CURRIE, B. J.; LUM, G.; VANDAMME, P. A. R. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2011. p.692-713.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n.2, p.194-222, 2002.

MAHENTHIRALINGAM, E.; CAMPBELL, M.; SPEERT, D. P. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. **Infect Immun**, v.62, n.2, p.596-605, 1994.

MATOS, A. P. **Avaliação da microbiologia e da cultura quantitativa bacteriana de amostras de pacientes com fibrose cística**. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

McCULLOCH, E.; LUCAS, C.; RAMAGE, G.; WILLIAMS, C. Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. **J Cyst Fibros**, v.10, n.1, p.21-24, 2011.

MILAGRES, L.; GARCIA, D.; CASTRO, T.; TAVARES, K.; LEÃO, R.; FOLESCU, T.; HIGA, L.; MARQUES, E. Infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística: diagnóstico sorológico e conduta. **Pediatria (São Paulo)**, v.30, n.1, p.56-65, 2008.

MILAGRES, L. G.; CASTRO, T. L.; GARCIA, D.; CRUZ, A. C.; HIGA, L.; FOLESCU, T.; MARQUES, E. A. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.44, n.4, p.392-401, 2009.

MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.41, n.9, p.4009-4015, 2003.

MOREHEAD, R. S.; PINTO, S. J. Ventilator-associated pneumonia. **Arch Intern Med**, v.160, n.13, p.1926-1936, 2000.

MOSS, J.; EHRMANTRAUT, M. E.; BANWART, B. D.; FRANK, D. W.; BARBIERI, J. T. Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. **Infect Immun**, v.69, n.2, p.1185-1188, 2001.

OGLE, J. W.; JANDA, J. M.; WOODS, D. E.; VASIL, M. L. Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Dis**, v.155, n.1, p.119-126, 1987.

PINHEIRO, R. L.; MURO, M. D.; FERNANDES, G. P. **Identificação de fungos e leveduras**. Curitiba, UFPR, UAD, 7 de novembro de 2011. Comunicação verbal.

PRESSLER, T.; FREDERIKSEN, B.; SKOV, M.; GARRED, P.; KOCH, C.; HØIBY, N. Early rise of anti-*Pseudomonas* antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection - A case control study. **J Cyst Fibros**, v.5, p.9-15, 2006.

PRESSLER, T.; KARPATI, F.; GRANSTRÖM, M.; KNUDSEN, P. K.; LINDBLAD, A.; HJELTE, L.; OLESEN, H. V.; MEYER, P.; HØIBY, N.; SCANDINAVIAN CF STUDY CONSORTIUM. Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. **J Cyst Fibros**, v.8, p.37-42, 2009.

RAMSEY, B. W.; WENTZ, K. R.; SMITH, A. L.; RICHARDSON, M.; WILLIAMS-WARREN, J.; HEDGES, D. L.; GIBSON, R.; REDDING, G. J.; LENT, K.; HARRIS, K. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. **Am Rev Respir Dis**, v.144, n.2, p.331-337, 1991.

RAMSEY, B. W. What is the role of upper airway bacterial cultures in patients with cystic fibrosis? **Pediatr Pulmonol**, v.21, n.5, p.265-266, 1996.

RASKIN, S.; PEREIRA-FERRARI, L.; REIS, F. C.; ABREU, F.; MAROSTICA, P.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.; LUDWIG, N.; VALENTIN, L.; ROSARIO-FILHO, N. A.; CAMARGO NETO, E.; LEWIS, E.; GIUGLIANI, R.; DINIZ, E. M.; CULPI, L.; PHILLIP, J. A.; CHAKRABORTY, R. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. **J Cyst Fibros**, v.7, n.1, p.15-22, 2008.

RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. **Lancet**, v.361, n.9358, p.681-689, 2003.

RATJEN, F.; WALTER, H.; HAUG, M.; MEISNER, C.; GRASEMANN, H.; DÖRING, G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **Pediatr Pulmonol**, v.42, n.3, p.249-255, 2007.

RAZVI, S.; QUITTELL, L.; SEWALL, A.; QUINTON, H.; MARSHALL, B.; SAIMAN, L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. **Chest**, v.136, n.6, p.1554-1560, 2009.

RIVERA, M.; MCGROARTY, E. J. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v.171, n.4, p.2244-2248, 1989.

ROSENFELD, M.; EMERSON, J.; ACCURSO, F.; ARMSTRONG, D.; CASTILE, R.; GRIMWOOD, K.; HIATT, P.; McCOY, K.; MCNAMARA, S.; RAMSEY, B.; WAGENER, J. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.28, n.5, p.321-328, 1999.

SANTANA, M. A.; MATOS, E.; DO SOCORRO FONTOURA, M.; FRANCO, R.; BARRETO, D.; LEMOS, A. C. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.7, n.1, p.69-72, 2003.

SANTOS, G. P.; DOMINGOS, M. T.; WITTIG, E. O.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N. A. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Parana: evaluation 30 months after implementation. **J Pediatr**, v.81, n.3, p.240-244, 2005.

SCHAAD, U. B.; LANG, A. B.; WEDGWOOD, J.; BUEHLAMNN, U.; FUERER, E. Serotype-specific serum IgG antibodies to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlation to disease, subclass distribution, and experimental protective capacity. **Pediatr Res**, v.27, n.5, p.508-513, 1990.

SHRYOCK, T. R.; MOLLÉ, J. S.; KLINGER, J. D.; THOMASSEN, M. J. Association with phagocytic inhibition of anti-*Pseudomonas aeruginosa* immunoglobulin G antibody subclass levels in serum from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.23, n.3, p.513-516, 1986.

SPEERT, D. P.; CAMPBELL, M. E.; HENRY, D. A.; MILNER, R.; TAHA, F.; GRAVELLE, A.; DAVIDSON, A. G.; WONG, L. T.; MAHENTHIRALINGAM, E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. **Am J Respir Crit Care Med**, v.166, n.7, p.988-993, 2002.

SOUZA, H. A.; NOGUEIRA, K. S.; MATOS, A. P.; VIEIRA, R. P.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N. A.; TELLES, F. Q.; DALLA COSTA, L. M. Colonização microbiana precoce de pacientes identificados por triagem neonatal para fibrose cística, com ênfase em *Staphylococcus aureus*. **J Pediatr** v.82, n.5, p.377-382, 2006.

STALLINGS, V. A.; STARK, L. J.; ROBINSON, K. A.; FERANCHAK, A. P.; QUINTON, H.; CLINICAL PRACTICE GUIDELINES ON GROWTH AND NUTRITION SUBCOMMITTEE; AD HOC WORKING GROUP. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. **J Am Diet Assoc** v.108, n.5, p.832-839, 2008.

SUBBARAO, P.; BALKOVEC, S.; SOLOMON, M.; RATJEN, F. Pilot study of safety and tolerability of inhaled hypertonic saline in infants with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.42, n.5, p.471-476, 2007.

TANCREDE, C. H.; ANDREMONT, A. O. Bacterial translocation and gram-negative bacteremia in patients with hematological malignancies. **J Infect Dis**, v.152, n.1, p.99-103, 1985.

THOMASSEN, M. J.; DEMKO, C. A.; WOOD, R. E.; TANDLER, B.; DEARBORN, D. G.; BOXERBAUM, B.; KUCHENBROD, P. J. Ultrastructure and function of alveolar macrophages from cystic fibrosis patients. **Pediatr Res**, v.14, n.5, p.715-721, 1980.

TRAMPER-STRANDERS, G. A.; van der ENT, C. K.; WOLFS, T. F. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v.4, suppl. 2, p.37-43, 2005.

TRAMPER-STRANDERS, G. A.; van der ENT, C. K.; SLIEKER, M. G.; TERHEGGEN-LAGRO, S. W.; TEDING VAN BERKHOUT, F.; KIMPEN, J. L.; WOLFS, T. F. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. **Thorax**, v.61, n.8, p.689-693, 2006.

WEISNER, A. M.; CHART, H.; BUSH, A.; DAVIES, J. C.; PITT, T. L. Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in serum and oral fluid from patients with cystic fibrosis. **J Med Microbiol**, v.56, n.5, p.670-674, 2007.

WEST, S. E. H.; ZENG, L.; LEE, B. L.; KOSOROK, M. R.; LAXOVA, A.; ROCK, M. J.; SPLAINGARD, M. J.; FARRELL, P. M. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. **JAMA**, v.287, n.22, p.2958-2967, 2002.

WINNIE, G. B.; COWAN, R. G. Respiratory tract colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlations between anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody levels and pulmonary function. **Pediatr Pulmonol**, v.10, n.2, p.92-100, 1991.

WOODS, D. E.; SCHAFFER, M. S.; RABIN, H. R.; CAMPBELL, G. D.; SOKOL, P. A. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. **J Clin Microbiol**, v.24, n.2, p.260-264, 1986.

XU, J.; MOORE, J. E.; MURPHY, P. G.; MILLAR, B. C.; ELBORN, J. S. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*--comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.3, p.21, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE 1
APROVAÇÃO DO PROJETO DE TESE PELO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 02 de setembro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Helena Aguilar Peres Homem de Mello
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA E DA INFLAMAÇÃO EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 30 de agosto de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP: 1104.143/2005-08

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 02 de março de 2006.

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

APÊNDICE 2
APROVAÇÃO DOS TERMOS DE CONSENTIMENTO PELO COMITÊ DE ÉTICA



CEP/HC/UFPR



10 Anos

Curitiba, 24 de setembro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Helena Aguilar Peres Homem de Mello
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que os **Termos de Consentimento Livre e Esclarecido**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA E DA INFLAMAÇÃO EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA", foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Os referidos documentos atendem aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

Registro CEP: 1104.143/2005-08

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Renato", is written over a horizontal line.

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO DOS CONTROLES NEGATIVOS



HOSPITAL DE CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O médico (a) que está atendendo seu filho (a) solicitou coleta de amostra de sangue para exames laboratoriais no serviço de Análises Clínicas deste hospital, e aproveitamos a oportunidade para convidá-lo a participar de um estudo intitulado **"Estudo da evolução da colonização microbiana e da inflamação em crianças com fibrose cística"**. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e a participação de pacientes que não têm esta doença é de fundamental importância.

O objetivo da pesquisa é estudar alterações do sangue dos pacientes com fibrose cística, e o seu filho, COMO NÃO TEM A DOENÇA, pode contribuir para o estudo. Uma pequena porção do sangue que vai ser coletado de seu filho (a), e que seria descartada após a realização dos exames solicitados pelo médico que o atendeu, será separada para comparação com o sangue dos pacientes com fibrose cística.

Seu filho (a) não sofrerá nenhum risco ao participar da pesquisa, pois o sangue que será coletado é o que VAI SOBRA após a realização dos exames, e o benefício esperado é o aumento da qualidade de vida dos pacientes com fibrose cística, com a diminuição das infecções e do processo inflamatório.

Em caso de dúvidas, os médicos responsáveis pelo estudo, **Dr. Nelson Augusto Rosário Filho** e **Dr. Carlos Antonio Riedi**, poderão ser contatados no Hospital de Clínicas, de segunda a sexta-feira, das 8 às 12 horas, pelo telefone: 3360-1800 ramal 6216, e a pesquisadora responsável pelas análises, **Dr.ª Helena A. P. Homem de Mello de Souza**, pelo telefone: 3360-7975, no mesmo horário.

A participação no estudo é voluntária, e você tem a liberdade de não permitir a participação de seu filho (a).

As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos médicos executores e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma de código, pois esses dados são confidenciais. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome de seu filho (a), e sim um código.

Pela participação no estudo, os voluntários não receberão qualquer valor em dinheiro.

Eu, _____, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa à qual meu filho(a) foi convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para não permitir a participação de meu filho (a) na pesquisa sem que esta decisão afete seu tratamento com o médico dele (a).

Concordo voluntariamente com que meu filho (a) _____ participe deste estudo.

Curitiba, ____/____/____

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

ANEXO 2
TERMO DE CONSENTIMENTO DOS CONTROLES POSITIVOS



HOSPITAL DE CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho(a) tem a doença denominada **fibrose cística** e está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado "**Estudo da evolução da colonização microbiana e da inflamação em crianças com fibrose cística**". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e a participação de seu filho(a) é de fundamental importância.

O objetivo desta pesquisa é acompanhar a inflamação e a infecção bacteriana do pulmão de crianças com fibrose cística que foram diagnosticadas pelo teste do pezinho, a fim de tratar estas infecções e processos inflamatórios e melhorar a condição de vida destes pacientes.

Seu filho(a) continuará a fazer exames de escarro ou orofaringe, como de costume nas consultas médicas de rotina, e de sangue sempre que o médico achar necessário.

Seu filho(a) sofrerá riscos mínimos ao participar da pesquisa, os mesmos decorrentes do atendimento de rotina prestado nas consultas regulares (como o aparecimento de hematomas no local da punção para a coleta de sangue) e o benefício esperado é o aumento da qualidade de vida dos pacientes, com a diminuição das infecções e do processo inflamatório.

Seu filho contribuirá com a pesquisa na qualidade de controle positivo para a técnica de dosagem de anticorpos anti-*Pseudomonas*, uma vez que ele (a) é colonizado persistentemente com *P. aeruginosa*. Para tanto, uma pequena parte do sangue que será coletado para os exames de rotina será armazenada para posterior investigação.

Os médicos responsáveis pelo atendimento de seu filho(a), **Dr. Nelson Augusto Rosário Filho** e **Dr. Carlos Antonio Riedi**, poderão ser contatados no Hospital de Clínicas, de segunda a sexta-feira, das 8 às 12 horas, pelo telefone: 3360-1800 ramal 6216.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar que seu filho(a) participe do estudo, ou, se aceitar participar, de retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do atendimento do seu filho(a), que está garantido.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma de código, pois esses dados são confidenciais. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome de seu filho(a), e sim um código.

Pela participação no estudo, os pais ou responsáveis pelo paciente não receberão qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio Hospital de Clínicas.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual meu filho(a) foi convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação de meu filho(a) no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete seu tratamento com o médico dele(a). Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente com que meu filho(a) _____ participe deste estudo.

Curitiba, ____/____/____

Assinatura do responsável legal pelo paciente

Assinatura do pesquisador

ANEXO 3
TERMO DE CONSENTIMENTO DOS SUJEITOS DA PESQUISA



HOSPITAL DE CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho(a) tem a doença denominada **fibrose cística** e está sendo convidado(a) a participar de um estudo titulado "**Estudo da evolução da colonização microbiana e da inflamação em crianças com fibrose cística**". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e a participação de seu filho(a) é de fundamental importância.

O objetivo desta pesquisa é acompanhar a inflamação e a infecção bacteriana do pulmão de crianças com fibrose cística que foram diagnosticadas pelo teste do pezinho, a fim de se tratar estas infecções e processos inflamatórios e melhorar a condição de vida destes pacientes.

Seu filho(a) continuará a fazer exames da garganta e de sangue, como de costume nas consultas médicas de rotina.

Seu filho(a) sofrerá riscos mínimos ao participar da pesquisa, os mesmos decorrentes do atendimento de rotina prestado nas consultas regulares (aparecimento de hematomas no local da punção para a coleta de sangue) e os benefícios esperados são: aumento da qualidade de vida dos pacientes, com a diminuição das infecções e do processo inflamatório.

Os médicos responsáveis pelo atendimento de seu filho(a), **Dr. Nelson Augusto Rosário Filho** e **Dr. Carlos Antonio Riedi**, poderão ser contatados no Hospital de Clínicas, de segunda a sexta-feira, das 8 às 12 horas, no 14.º andar, telefone: 3360-1800 ramal 6216.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar que seu filho(a) participe do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do atendimento do seu filho(a), que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma de código, pois esses dados são confidenciais.

Pela participação no estudo, os pais ou responsáveis pelo paciente não receberão qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio Hospital de Clínicas.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome de seu filho(a), e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual meu filho(a) foi convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação de meu filho(a) no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete seu tratamento com o médico dele(a). Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente com que meu filho(a) _____ participe deste estudo.

Curitiba, ____/____/____

Assinatura do responsável legal pelo paciente